Aus dem Institut für Physiologische Chemie I der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. Sies

CHARAKTERISIERUNG DES KANALIKULÄREN GLUTATHIONDISULFID-TRANSPORTSYSTEMS UND DIE BEDEUTUNG DES THIOL-STATUS DER LEBER FÜR DIE AUSSCHEIDUNG VON TAUROCHOLAT IN DIE GALLE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

MANFRED BILZER

1986

THE LIBRARY OF THE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0068

Aus dem Institut für Physiologische Chemie I der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. Sies

CHARAKTERISIERUNG DES KANALIKULÄREN GLUTATHIONDISULFID-TRANSPORTSYSTEMS UND DIE BEDEUTUNG DES THIOL-STATUS DER LEBER FÜR DIE AUSSCHEIDUNG VON TAUROCHOLAT IN DIE GALLE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

MANFRED BILZER

1986

"Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf"

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr. Sies
Korreferent
gez.: Prof. Dr. Teschke

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Abkürzungen	1
1.	Einleitung	2
1.1	Lipidperoxidation	2
1.2	Schutzmechanismen der Zelle	3
1.3	Glutathion: Eigenschaften und Bedeutung	4
1.4	Der hepatische Gallensäurentransport	6
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit	8
2.	Material und Methoden	10
2.1	Hämoglobinfreie Leberperfusion	10
2.2	Behandlung der Tiere	11
2.3	Präparation der Leberextrakte zur Bestimmung der intrazellulären GSH- und GSSG-Gehalte	11
2.4	Präparation der Leber zur Bestimmung des intrazellulären Taurocholat-Gehaltes	12
2.5	Korrektur der intrazellulären Taurocholat- und GSSG-Gehalte	12
2.6	Bestimmung der GSSG-Konzentration	13
2.7	Bestimmung der GSH-Konzentration	13
2.8	Bestimmung des S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion	13
2.9	Bestimmung von Taurocholat	13
2.10	Bestimmung von t-Butylhydroperoxid	14

2.11	Bestimmung der Monoamin-Oxidation	14
2.12	Präparation von S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion	14
2.13	Präparation und Bestimmung von Sulfobromophthalein S-glutathion	15
2.14	Enzymkinetische Untersuchungen mit der Glutathion-Reduktase menschlicher Erythrozyten	15
2.15	Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Rattenleberextrakt	16
2.16	Bestimmung der selenabhängigen Glutathion-Peroxidase-Aktivität im Lebergewebe	16
2.17	Bestimmung der LDH-Aktivität im effluenten Perfusat	16
2.18	Registrierung der O_2-Konzentration im effluenten Perfusat	16
2.19	Chemikalien und Enzyme	17
3.	Ergebnisse	18
3.1	Die Beziehung zwischen Glutathiondisulfid-Efflux in die Galle und intrazellulärem Glutathiondisulfid-Gehalt der perfundierten Rattenleber	18
3.1.1	Intrazelluläre Gehalte des oxidierten und reduzierten Glutathions	19
3.1.2	Glutathion-Efflux in die Galle	21
3.1.3	Gesteigerter GSSG-Efflux in die Galle während der Metabolisierung von Hydroperoxiden	25
3.1.4	Beziehung zwischen intrazellulärem GSSG-Gehalt und GSSG-Efflux in die Galle	28

3.2 Kompetition zwischen Glutathiondisulfid- und Glutathion S-Konjugat-Transport in die Galle der perfundierten Rattenleber 33

3.2.1 Reduzierter GSSG-Transport in die Galle während der biliären S-Konjugat-Ausscheidung 34

3.2.2 Der intrazelluläre GSSG-Gehalt während der S-Konjugat-Ausscheidung in Anwesenheit von t-Butylhydroperoxid und Nitrofurantoin 34

3.2.3 Beziehung zwischen GSSG-Efflux in die Galle und intrazellulärem GSSG-Gehalt in Anwesenheit von Menadion 39

3.2.4 Inhibierung des S-Konjugat-Transports in die Galle während stimulierter GSSG-Ausscheidung 39

3.3 Inhibierung der Glutathion-Reduktase durch Glutathion S-Konjugate 46

3.3.1 Exzessive GSSG-Akkumulation in der Rattenleber während der Inhibierung des biliären GSSG-Transports 46

3.3.2 Inhibierung der Glutathion-Reduktase der Rattenleber durch Glutathion S-Konjugate 48

3.3.3 Enzymkinetische Untersuchung der Inhibierung menschlicher GSSG-Reduktase durch Glutathion S-Konjugate und ihren elektrophilen Vorstufen 50

3.4 Der Einfluß von Glutathion und Glutathion S-Konjugaten auf die Ausscheidung von Taurocholat in die Galle 57

3.4.1 Taurocholat-Aufnahme und Ausscheidung in die Galle während der Infusion von Diamid und Menadion 58

3.4.2 Beeinflussung der Taurocholat-Ausscheidung durch H_2O_2 und t-Butylhydroperoxid 62

3.4.3 Intrazelluläre Taurocholat-Akkumulation während der Infusion von t-Butylhydroperoxid 62

3.4.4 Taurocholat-Efflux in die Galle von Selen-Mangel-Lebern 65

3.4.5 Beziehung zwischen der Inhibierung der biliären Taurocholat-Ausscheidung und dem intrazellulären GSSG-Gehalt 67

3.4.6 Einfluß der Glutathion S-Konjugation elektrophiler Agentien auf die biliäre Taurocholat-Ausscheidung 70

4. Diskussion 74

4.1 Erhöhung des intrazellulären GSSG-Gehalt unter oxidativen Bedingungen 74

4.2 Die Glutathion-Ausscheidung unter verschiedenen metabolischen Bedingungen 75

4.3 Das kanalikuläre GSSG- und S-Konjugat-Transportsystem der Leber 77

4.4 Die Bindung von Glutathion S-Konjugaten und ihren elektrophilen Vorstufen an der Glutathion-Reduktase 81

4.5 Die Beeinflussung der Taurocholat-Ausscheidung durch Änderungen im Thiol-Status der Leber 84

5. Zusammenfassung 87

6. Literatur 88

Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
t-BOOH	tertiäres Butylhydroperoxid
BSP	Sulfobromophthalein
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GSH	reduziertes Glutathion, Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion, Glutathiondisulfid
NAD^+	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid, oxidiert
NADH	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid, reduziert
$NADP^+$	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
TC	Taurocholat

1. Einleitung

Die Möglichkeit, daß Zellschäden durch Lipidperoxidation induzierende Substanzen bedingt sind (1) , führt zu dem besonderen Interesse, Lipidperoxidation verhindernde Schutzmechanismen und durch letztere entstehende Metabolite, insbesondere deren Ausscheidung, zu charakterisieren. Verstärkt wird dieses Interesse durch die Möglichkeit, daß Lipidperoxidation induzierende Metabolite auch Proteine (Enzymschäden) (2) und DNA (Mutagenität) (3) schädigen.

1.1 Lipidperoxidation

Peroxidation von Fetten umfaßt die Reaktion von Sauerstoff mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren unter Bildung freier Lipidradikale und semistabiler Hydroperoxide, die dann zu Radikalkettenreaktionen führen (4). Die Peroxidation membrangebundener Lipide kann Membranschäden und somit Zellschäden und Zelltod zur Folge haben. Erster Schritt der Lipidperoxidation ist die Initiierung von Lipidradikalen durch Wasserstoffabstraktion, die mit molekularem Sauerstoff zu Lipidperoxyradikalen reagieren (5). H_2O_2 und Sauerstoffspezies wie $^1O_2$, O_2^- und $OH^\cdot$ sind an der Bildung und Kettenreaktion freier Radikale beteiligt (6). Eine von mehreren diskutierten Möglichkeiten der Initiierung von Lipidradikalen ist die Interaktion von H_2O_2 und O_2 , durch die es zur Bildung von $OH^\cdot$ und $^1O_2$ kommt, die dann mit ungesättigten Fettsäuren unter Bildung eines Lipidradikals reagieren (7). O_2^- wird in verschiedenen enzymatischen Reaktionen gebildet, wozu Reaktionen der Xanthin-Oxidase, Aldehyd-Oxidase, des Zytochrom P 450 - Systems und Autoxidation von reduzierten Flavinen und Hydrochinonen gehören (6, 8). H_2O_2 entsteht durch die Reaktion verschiedener Oxidasen, wie Monoamino-Oxidasen, Xanthin-Oxidase und Aldehyd-Oxidase, weiterhin

durch die Superoxid-Dismutase (6) (Fig. 1).

1.2 Schutzmechanismen der Zelle

Schutz gegenüber den an der Lipidperoxidation beteiligten Moleküle besitzt die Zelle durch die Anwesenheit verschiedener "Schutzenzyme".

Die Superoxid-Dismutase setzt O_2^- zu H_2O_2 und O_2 um (9) und vermindert Lipidperoxidation (7). Sie befindet sich sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien (6).

Die Katalase, die in den Peroxisomen lokalisiert ist, setzt H_2O_2 zu H_2O und O_2 um. Weiterhin besitzt sie Peroxidase-Aktivität; in diesem Fall dient ein Alkohol als Wasserstoffdonor (6).

Die Katalase wird im H_2O_2 -Metabolismus durch die Glutathion-Peroxidase ergänzt, die im Zytosol und den Mitochondrien zu finden ist (6) und das hier und in den Mikrosomen entstehende H_2O_2 metabolisiert, bevor es die Peroxisomen erreicht (10, 11). Sie katalysiert die Reaktion von H_2O_2 und organischen Hydroperoxiden mit Glutathion, unter Bildung von Glutathiondisulfid und dem entsprechenden Alkohol (Fig. 1):

$$ROOH + 2\ GSH \longrightarrow ROH + GSSG + H_2O \quad (12).$$

In der Rattenleber ist die selenabhängige Glutathion-Peroxidase, die H_2O_2 und organische Hydroperoxide umsetzt, von der selenunabhängigen Peroxidase zu unterscheiden. Letztere, die als GSH S-Transferase 1-2 und 2-2 identifiziert wurde (13), metabolisiert nur organische Hydroperoxide (14).

Ausreichende GSH-Konzentrationen werden der Glutathion-Peroxidase durch die Reaktion der Glutathion-Reduktase gesichert, die Glutathiondisulfid unter NADPH-Verbrauch reduziert (15, 16):

$$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow 2\ GSH + NADP^+ .$$

UNIV. LEIDEN BIBL.

Enthemmung der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase durch GSSG und Oxidation von NADPH zu $NADP^+$ (17) führen zu einem gesteigerten Glukoseverbrauch durch den Pentosephosphat-Zyklus und somit zur Bereitstellung von NADPH (18).
Mangel dieser Enzyme führt zu verschiedenen hämatologischen Erkrankungen wie chronische hämolytische Anämie (19), während Glutathionverarmung der Zelle durch Diethylmaleat die Lipidperoxidation in vitro steigert (20), vermutlich bedingt durch Substratmangel der Glutathion-Peroxidase. Diese Beispiele unterstreichen die Bedeutung dieser Enzyme, insbesondere die des Glutathions.

1.3 Glutathion: Eigenschaften und Bedeutung

Glutathion ist in der Natur ubiquitär vorhanden und überwiegend intrazellulär in Konzentrationen zwischen 0.5 und 10 mM zu finden. Die Synthese erfolgt über den Cystathionin-Weg (21) und γ-Glutaminsäure-Zyklus (22).
Glutathion besitzt als potentes Redox-System wichtige Schutzfunktionen. Sies et al. (18, 23) zeigten, daß H_2O_2 und organische Hydroperoxide die GSSG-Ausscheidung der perfundierten Rattenleber erhöhen. Zwischen der Hydroperoxid-Aufnahme der Leber und dem GSSG-Efflux bestand eine lineare Beziehung (18). Aus dem induzierten GSSG-Efflux mußte weiterhin geschlossen werden, daß die Glutathion-Reduktase nicht das gesamte beim Hydroperoxid-Metabolismus entstehende Glutathiondisulfid umsetzen kann (18). GSSG-Freisetzung wurde von anderen Autoren an Erythrozyten und Augenlinsen beobachtet (24, 25). Die GSSG-Ausscheidung der perfundierten Rattenleber erfolgt in die Galle (Fig. 1). GSSG-Efflux in den sinusoidalen Raum unter Zugabe hoher Hydroperoxid-Konzentrationen wurde als Überlastung der biliären Ausscheidung interpretiert (26). Da GSSG das kritische Molekulargewicht von 325 überschreitet (27), muß angenommen werden, daß der Ausscheidung ein kanalikulärer Exportmechanismus zu Grunde liegt.

Hinweis auf einen aktiven Transportmechanismus gibt der Konzentrationsgradient zwischen der intrazellulären GSSG-Konzentration, 0.03 mM (28), und der GSSG-Konzentration in der Galle, 0.45 $\pm$ 0.23 mM (26), unter Kontrollbedingungen. Beutler et al. (29) fanden an Inside-Out-Vesikeln menschlicher Erythrozyten einen ATP-abhängigen GSSG-Transport. Der GSSG-Efflux der Rattenleber ist unidirektional, d.h. extern zugegebenes GSSG wird nicht vom Hepatozyten aufgenommen (30).

Somit wird die intrazelluläre GSSG-Konzentration durch die Glutathion-Reduktase und die GSSG-Ausscheidung niedrig gehalten. Dies ist insofern von Bedeutung, da komplexe Prozesse wie Proteinsynthese (31) oder Enzymregulation (32) vom intrazellulären Thiol/Disulfid-Status beeinflußt werden, der sich unter oxidativen Bedingungen ändert.

Im Gegensatz zum oxidierten Glutathion wird GSH in den sinusoidalen Raum abgegeben und ist in der Galle der perfundierten Rattenleber unter Kontrollbedingungen in sehr differierenden Konzentrationen zu finden (26, 33). Der sinusoidale GSH-Efflux wird unter oxidativen Bedingungen nicht beeinflußt (26). Auch die sinusoidale GSH-Ausscheidung ist unidirektional (34). Die Leber ist somit eine wichtige Quelle des Plasma-Glutathions (Fig. 1).

Eine weitere Funktion des Glutathions ist die Reaktion mit elektrophilen Molekülen zu Glutathion S-Konjugaten, die weniger toxisch und wasserlöslich sind. Die Bildung von Glutathion S-Konjugaten wird von einer Gruppe multifunktioneller Enzyme katalysiert, den Glutathion S-Transferasen (35, 36). Die S-Transferasen besitzen überlappende Substratspezifitäten (35). Die S-Transferase-Aktivitäten sind im Zytosol und der mitochondrialen Matrix zu finden (37). Besondere Bedeutung könnte ihre Lokalisation in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums besitzen (38). So wird z.B. das beim mikrosomalen Benzo(a)pyren-Metabolismus entstehende Epoxid unter anderem durch S-Konjugation entgiftet (39). Die S-Konjugation ist

der erste Schritt der Merkaptursäure-Biosynthese (40). Merkaptursäuren werden überwiegend renal ausgeschieden, während die Ausscheidung der S-Konjugate in die Galle und den sinusoidalen Raum erfolgt (36, 41, 42) (Fig. 1). Für S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion konnte in der Galle ein Konzentrationsmaximum nachgewiesen werden (41). Aus diesen Ergebnissen leitete sich die Möglichkeit ab, daß Glutathiondisulfid, ähnlich den S-Konjugaten, als "Homokonjugat des Glutathions" ausgeschieden wird (26).

1.4 Der hepatische Gallensäurentransport

Die Ausscheidung gallengängiger Metabolite wird durch Faktoren wie Alter, Geschlecht, Metabolismus und der Interaktion mit anderen Metaboliten beeinflußt (43). Die Ausscheidung solcher Moleküle, insbesondere die Regulation dieser Exportmechanismen wird bisher nur wenig verstanden. Einerseits wird die biliäre Ausscheidung von Polarität und Ladung der Moleküle bestimmt, andererseits durch ihr Molekulargewicht (43). So erfordert der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren ihre sinusoidale Aufnahme, ihren Transport durch die Leber und Konjugation unkonjugierter Gallensäuren und die Ausscheidung in die Galle (44) (Fig. 1). Die Aufnahme der Gallensäuren erfolgt über ein Carrier-vermitteltes Transportsystem, das durch Gallensäuren hemmbar ist (45). Der Transport durch die Leber erfolgt durch Transportproteine (46, 47). Die Ausscheidung der Gallensäuren ist vermutlich ein aktiver Transport, für den Paumgartner et al. (48) ein Transportmaximum fanden. Gallensäuren sind starke Choleretika. Zwischen der Gallensäuren-Ausscheidung und dem Gallefluß besteht eine lineare Beziehung, die für den gallensäureabhängigen Gallefluß verantwortlich ist (48, 49). Gallensäuren steigern die Ausscheidung verschiedener Metabolite (43), u.a. die der Glutathion S-Konjugate (41).

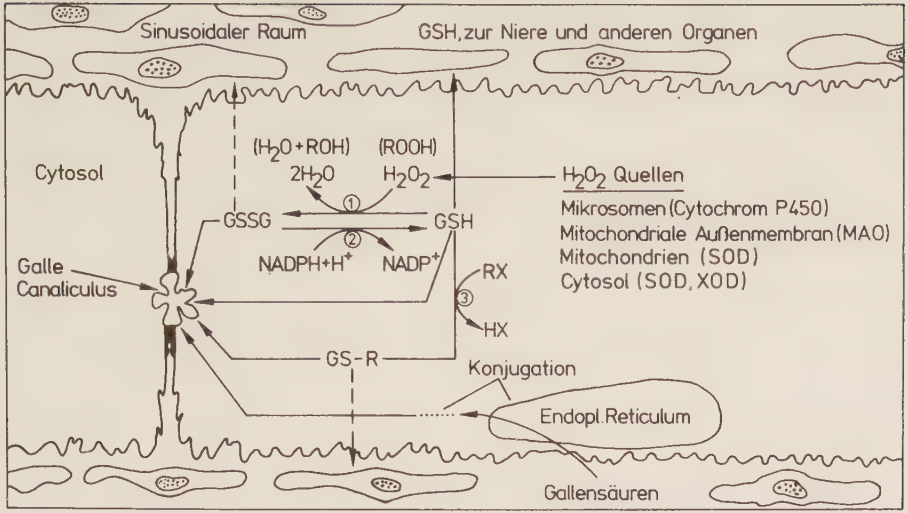

Fig. 1

Zusammenfassung der wichtigsten, in den Versuchen verwendeten Stoffwechsel- und Transportwege.

Die Abkürzungen sind: MAO, Monoamino-Oxidase; SOD, Superoxid-Dismutase; XOD, Xanthin-Oxidase; ROOH, organische Hydroperoxide; RX, elektrophile Agentien; GS-R, Glutathion S-Konjugate; 1, Glutathion-Peroxidase; 2, Glutathion-Reduktase; 3, Glutathion S-Transferasen.

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet die Untersuchung, inwiefern die kanalikuläre GSSG-Ausscheidung der perfundierten Rattenleber die Eigenschaften eines trägervermittelten Transportsystems besitzt und durch die Ausscheidung anderer, gallegängiger Metabolite beeinflußt werden kann.

Da GSSG unter oxidativen Bedingungen vermehrt ausgeschieden wird und bei Verwendung entsprechender Substrate ein Maß für den Umsatz von Hydroperoxiden durch die Glutathion-Peroxidase darstellt, wird in 3.1 untersucht, ob unter diesen Bedingungen der GSSG-Gehalt der Leber ebenfalls ansteigt und mit dem gesteigerten GSSG-Efflux in die Galle korreliert. Die Kenntnis derartiger Beziehungen unter verschiedenen Bedingungen besitzt den Vorteil, daß man bei alleiniger Bestimmung der GSSG-Ausscheidung in die Galle Aussagen über den intrazellulären GSSG-Gehalt machen kann, der vielleicht mit lipidperoxidativen Reaktionen korreliert, die durch Änderungen im Thiol-Status der Leber bedingt sind.

Von dieser Beziehung ausgehend, wird in 3.2 die Inhibierung der GSSG-Ausscheidung in die Galle untersucht, ein wichtiges Kriterium des trägervermittelten Transports. Zur Inhibierung werden Glutathion S-Konjugate in der Annahme gewählt, daß Glutathionspezies über den gleichen Exportmechanismus ausgeschieden werden. Weiterhin wird umgekehrt untersucht, ob die Stimulation der biliären GSSG-Ausscheidung die S-Konjugat-Ausscheidung in die Galle beeinflußt.

In 3.3 wird untersucht, ob Glutathion S-Konjugate die Glutathion-Reduktase hemmen. Hier erschien die Möglichkeit bedeutsam, daß S-Konjugate, ähnlich wie das "Homokonjugat" GSSG, mit ihrem Glutathion-Anteil am aktiven Zentrum der Glutathion-Reduktase binden und durch Inhibierung dieses wichtigen Enzyms zu Änderungen im GSH/GSSG-Status der Leber führen. Inhibierungsstudien werden mit Leberextrakten, enzymkinetische Untersuchungen mit der gereinigten Glutathion-Reduktase

menschlicher Erythrozyten durchgeführt.
Bisher fehlende Kenntnisse über die Bedeutung des intrazellulären Glutathion-Redox-Status der Leber für Transportprozesse der sinusoidalen und kanalikulären Membran führten zu der Fragestellung in 3.4, ob Änderungen des Redox-Status unter oxidativen Bedingungen oder während der S-Konjugation elektrophiler Agentien die Aufnahme oder Ausscheidung von Gallensäuren beeinflussen.

2. Material und Methoden

2.1 Hämoglobinfreie Leberperfusion

180 - 250 g schwere, männliche Wistarratten, gefüttert mit dem Standardfutter der Firma Altromin (Lage), waren Versuchstiere für die hämoglobinfreie, nicht rezirkulierende Leberperfusion. Perfundiert wurde mit Standard-Bicarbonat gepufferter Elektrolytlösung (50). Die Leberperfusion erfolgte in situ. Der Perfusatdurchfluß durch die Leber wurde während der Versuche konstant gehalten und betrug 4 ml x min^{-1} x g $Leber^{-1}$ (Feuchtgewicht). Der Gallegang wurde mit einem Polyethylen-Tubus (Länge: 5 cm, Innendurchmesser: 0.4 mm, totales Innenvolumen: 6 µl) der Firma Portex (Hythe, England) kanüliert. Substanzzugaben, durch Wechseln des Perfusionsmediums oder direkt durch Infusionspumpen, erfolgten nach 30 Minuten substratfreier Perfusion.

Gallen- und Perfusatproben wurden in Intervallen von 2, 3 oder 5 Minuten gesammelt, die Galle in vorgekühlten (0°C) Eppendorf Cups oder in 30 µl Metaphosphorsäure (5%), letzteres Verfahren zur Vermeidung der GSH-Autoxidation zu GSSG.

Versuche, in denen intrazelluläre Metabolite bestimmt wurden, endeten durch Frierstop eines Leberlappens. In einzelnen Versuchen, die über den Frierstop hinaus fortgeführt wurden, sollte Abbinden des verbliebenen Lappenrestes Perfusat- und Galleverluste durch die Schnittstelle vermeiden.

Einige Versuche wurden bei intaktem Kreislauf der Ratte durchgeführt. Hier wurde nur der Gallegang kanüliert.

2.2 Behandlung der Tiere

Wenige Minuten vor den Versuchen wurden die Tiere mit Nembutal, das intraperitoneal injiziert wurde (1 ml/kg Körpergewicht), anästhesiert.

Zur Glutathionverarmung der Leber erhielten einzelne Tiere eine Vorbehandlung mit Phoron. 0.5 ml Phoron (6.3 M) in 1.4 ml Olivenöl gelöst, wurden 2 h vor dem Versuch intraperitoneal injiziert (1 ml/kg Körpergewicht) (51).

Zur Senkung der selenabhängigen Glutathion-Peroxidase-Aktivität erhielten einzelne Tiere über 4 - 8 Wochen selenfreies Futter der Firma Altromin (Lage).

2.3 Präparation der Leberextrakte zur Bestimmung der intrazellulären GSH- und GSSG-Gehalte

Da das intrazelluläre Verhältnis GSH/GSSG ca. 300 beträgt, erfordert die intrazelluläre GSSG-Bestimmung eine besondere Präparation des Lebergewebes zur Vermeidung der GSH-Autoxidation zu GSSG. Es wurde die von Akerboom und Sies beschriebene Methode verwendet (52). Die gefrorene Leberprobe wurde in einem vorgekühlten Mörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Ca. 0.3 g Leberpulver, abgewogen in vorgekühlten Zentrifugenröhrchen, wurden mit 1.2 ml einer 1 M Perchlorsäure versetzt, die weiterhin EDTA (2 mM) enthielt. Der erhaltene Säureextrakt wurde zur Entfernung der Proteine 3 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert und 1.1 ml des abpipettierten Überstandes zu einem pH von 6.2 neutralisiert. Der Neutralisation diente eine N-Morpholinopropansulfonsäure (0.3 M) enthaltende 2 M KOH-Lösung. Die so aufgearbeiteten Proben wurden zur GSH-Bestimmung verwendet.

Zur Bestimmung des intrazellulären GSSG-Gehalts wurde, wie bisher beschrieben, verfahren, jedoch enthielt die verwendete Perchlorsäure

zusätzlich N-Ethylmaleat (50 mM), um das in hoher Konzentration vorliegende GSH zu binden und somit die Autoxidation zu verhindern. 1.4 ml der neutralisierten Extrakte wurden zur Entfernung des ungebundenen, sehr reaktiven N-Ethylmaleats auf eine zuvor mit Kaliumphosphat (10 mM, pH 6.2) äquilibrierte QAE-Sephadex-Säule (4 x 0.55 cm) aufgetragen und mit 10 ml gleicher Kaliumphosphatlösung eluiert. Die Elution des an Sephadex gebundenen GSSG erfolgte mit 4 ml Kaliumphosphat (250 mM, pH 6.2). Die so gewonnenen 4 ml GSSG-Eluat wurden zur enzymatischen Bestimmung der GSSG-Konzentration mit 0.15 ml obiger KOH-Lösung zu einem pH von 7.0-7.5 neutralisiert.

2.4 Präparation der Leber zur Bestimmung des intrazellulären Taurocholat-Gehaltes

Zur Bestimmung des intrazellulären TC-Gehaltes, durch Messung des (^{3}H)-Taurocholats im Szintilationszähler, wurden 0.5 g gefrorene Leber in 5 ml Kaliumphosphat-Puffer (0.1 M, pH 7.0) homogenisiert.

2.5 Korrektur der intrazellulären Taurocholat- und GSSG-Gehalte

Intrazelluläre Gehalte wurden unter Berücksichtigung der entsprechenden Gallekonzentrationen zur Zeit der Frierstops korrigiert. Zu dieser Korrektur wurde ein Gallevolumen von 2.3 µl/g Leber (Feuchtgewicht) angenommen (53). Die entsprechenden sinusoidalen Konzentrationen wurden nicht berücksichtigt, da sie in den Versuchen vernachlässigbar gering waren.

2.6 Bestimmung der GSSG-Konzentration

Die GSSG-Bestimmung erfolgte an einem Doppel-Wellenlängen Spektrophotometer (Sigma ZWS II, Biochem Co., München) durch Registrierung der NADPH-Oxidation bei 340-400 nm nach Starten des Testansatzes mit Glutathion-Reduktase (52). Der Extinktionskoeffizient des NADPH bei 340 nm beträgt $\epsilon_{340} = 6.22\ mM^{-1}\ cm^{-1}$.

2.7 Bestimmung der GSH-Konzentration

Die Summe des oxidierten und reduzierten Glutathions wurde durch einen kinetischen Test bestimmt (52, 54). Die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme während der nichtenzymatischen Reduktion von 5,5' Dithiobis(nitrobenzoesäure) (DTNB) durch GSH, wurde bei 405 nm an einem Eppendorf Photometer verfolgt. Das bei dieser Reaktion entstandene GSSG wurde enzymatisch durch die Glutathion-Reduktase zu GSH reduziert, so daß die Reaktionsgeschwindigkeit der DTNB-Reduktion konstant blieb. Die GSH-Konzentration wurde durch Subtraktion der nach 2.6 bestimmten GSSG-Konzentration berechnet. Durch einen internen Standard wurden Hemmungen des Tests erfaßt und korrigiert.

2.8 Bestimmung des S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion

Die Absorption des Glutathion S-Konjugats bei 334 nm wurde an einem Eppendorf Photometer bestimmt. Zur Berechnung wurde der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{334} = 9.6\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ verwendet (41, 55).

2.9 Bestimmung von Taurocholat

Die enzymatische Bestimmung von infundierten TC-Stammlösungen erfolgte am Doppel-Wellenlängen Spektrophotometer bei 340-400 nm. Verfolgt wurde die NAD-Reduktion nach Zugabe von Hydroxysteroid-

Dehydrogenase (56).

Die sinusoidale Aufnahme durch die Leber, die Ausscheidung in die Galle und der intrazelluläre TC-Gehalt wurden durch Infusion von (^{3}H)-Taurocholat (0.3 pCi x min^{-1} x g Leber^{-1}), das nicht markierten Stammlösungen zugefügt wurde, bestimmt. Die (^{3}H)-Taurocholat-Proben wurden im Szintillationszähler Kontron MR 300 gezählt.

2.10 Bestimmung von t-Butylhydroperoxid

t-Butylhydroperoxid wurde in einem gekoppelten Test bestimmt, indem das bei der Reaktion der Glutathion-Peroxidase mit t-Butylhydroperoxid entstandene GSSG nach der in 2.6 beschriebenen Methode bei 340-400 nm erfaßt wurde (18).

2.11 Bestimmung der Monoamin-Oxidation

Als Parameter der Monoamin-Oxidation wurde die gesteigerte Ausscheidung von NH_3 und Harnstoff ins effluente Perfusat verwendet. Die Bestimmung erfolgte mit Urease und Glutamat-Dehydrogenase nach der in (56) beschriebenen Methode.

2.12 Präparation von S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion

S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion wurde enzymatisch durch S-Konjugation von CDNB mit GSH durch dialysierte GSH S-Transferase (GSH-frei) synthetisiert. Das Präparat wurde nach der Methode von Awasthi et al. (57) durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt. Mit S-Transferase und GSH bestimmtes, verbliebenes CDNB im gereinigten Material betrug weniger als 1%, verbliebenes GSH oder GSSG, bestimmt durch HPLC (58), ebenfalls weniger als 1%.

2.13 Präparation und Bestimmung von Sulfobromophthalein S-glutathion

Sulfobromophthalein S-glutathion wurde nach der von Whelan et al. (59) beschriebenen Methode synthetisiert und gereinigt. Das BSP-freie Material wurde von nicht reagiertem GSH, GSSG und BSP-(GSH) durch präparative Dünnschichtchromatographie mit Merck Kieselgel-Platten im flüssigen System von n-Propanol, Wasser und Eisessig, im Verhältnis 10:5:1, getrennt. Erneute Chromatographie des gereinigten Präparats ergab nur die S-Konjugat-Bande. Die S-Konjugat-Konzentration wurde spektrophotometrisch bei 578 nm in 0.01 N KOH bestimmt. Zur Berechnung diente der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{578} = 68\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ (59, 60).

2.14 Enzymkinetische Untersuchungen mit der Glutathion-Reduktase menschlicher Erythrozyten

Das gereinigte Enzym (ca. 0.03 µg/ml) mit der spezifischen Aktivität von 143 U/mg Protein wurde in Anwesenheit von NADPH (0.1 mM) und verschiedenen Inhibitorkonzentrationen über 5 Minuten bei 25°C in Kaliumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7.0) inkubiert. Die Reaktion wurde mit GSSG (10 ul) in Konzentrationen zwischen 0.025 und 1.0 mM gestartet, die Oxidation des NADPH bei 340-400 nm verfolgt.
Zur Erstellung von Dixon-Diagrammen wurde die Inhibitor-Konzentration im Inkubationsansatz variiert und mit GSSG (0.5 mM) gestartet. Die Inhibierungskonstanten (K_i) der verschiedenen Inhibitoren wurden durch Sekundärdiagramme aus der Steigung der Geraden des Lineweaver-Burk-Diagramms bestimmt (61, 62).

2.15 Bestimmung der Glutathion-Reduktase-Aktivität im Rattenleberextrakt

Die Leber wurde in Phosphat-Puffer (0.05 M, pH 7.0), der EDTA (1 mM) enthielt, im Verhältnis 10 ml/g Leber homogenisiert. Nach 6 minütigem Zentrifugieren bei 105.000 g, wurde der Überstand zur Bestimmung der Enzymaktivität bei 25°C verwendet. Die Bestimmung erfolgte im oben beschriebenen Puffer, der weiterhin NADPH (0.2 mM) und Leberextrakt (10 µl) enthielt. Der Test wurde mit GSSG (0.5 mM) gestartet. Zum Nachweis der Enzymhemmung durch Glutathion S-Konjugate, erhielt der Testansatz weiterhin gereinigte S-Konjugate in verschiedenen Konzentrationen.

2.16 Bestimmung der selenabhängigen Glutathion-Peroxidase-Aktivität im Lebergewebe

Die selenabhängige Glutathion-Peroxidase-Aktivität wurde nach der in (63) beschriebenen Methode bestimmt. Der Test wurde mit H_2O_2 gestartet.

2.17 Bestimmung der LDH-Aktivität im effluenten Perfusat

Die Bestimmung erfolgte nach (56) am Eppendorf Photometer bei 366 nm.

2.18 Registrierung der O_2-Konzentration im effluenten Perfusat

Die Registrierung der O_2-Konzentration erfolgte durch eine Clark Platin-Elektrode. Die O_2-Konzentration des effluenten Perfusates betrug 0.1-0.2 mM.

2.19 Chemikalien und Enzyme

Boehringer, Mannheim: Adenosindiphosphat, Glutamat-Dehydrogenase (1.4.1.3), Glutathion-Reduktase aus Hefe (1.6.4.2), Glutathion (GSH), Glutathiondisulfid (GSSG), α-Ketoglutarat, NAD, NADP, NADPH, Pyruvat, Urease (3.5.1.5).

CEVA GMBH, Bad Segeberg: Nembutal

Fluka, Neu-Ulm: Phoron (2,6-Dimethyl-2,5-heptadien-4-on) Sulfobromophthalein (BSP) (Phenoltetrabromophthaleinsulfonsäure).

Merck, Darmstadt: EDTA, 5,5'Dithiobis (nitrobenzoesäure), Glycin, N-Ethylmaleat; Merck-DC-Platten (0.25 mm); sonstige Laborchemikalien.

MILES Laboratories, Kankakee: Pentex Bovine Albumine

NEN, Dreieich: (^{3}H)-Taurocholat.

Pharmacia, Uppsala, Schweden: QAE-Sephadex A 25.

Sigma, München: Benzylamin, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol, Diethylmaleat, Diamid (Diazendicarboxylsäure-bis (N,N-dimethylamid)), Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Gemisch aus 3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (1.1.1.50) und β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (1.1.1.51), Menadion (2-Methyl-1,4-naphthoquinon), Nitrofurantoin (1-(6-Nitrofurfurylidenamino) hydantoin), Pargylin, Tryptamin.

Zinsser Analytik GMBH, Frankfurt: Quickszint (phasenfreier Szintilator).

Glutathion-Peroxidase aus Rinder-Erythrozyten wurde freundlicherweise von Dr. A. Wendel (Universität Tübingen) und Glutathion-Reduktase menschlicher Erythrozyten von Prof. R.H. Schirmer (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. t-Butylhydroperoxid war ein Geschenk der Peroxid-Chemie (München).

3. Ergebnisse

3.1 Die Beziehung zwischen Glutathionreduktase-Effekten an der Zelle und intrazellulärem Glutathiondisulfid-Gehalt der perfundierten Rattenleber

Zur Variation intrazellulärer GSSG-Konzentrationen und der GSSG-Ausscheidung in die Galle wurden Substanzen infundiert, deren Metabolismus auf unterschiedliche Weise zur gesteigerten GSSG-Bildung führt.

a) Monoamine: Benzylamin und Tryptamin werden als Substrate der Monoamino-Oxidase zu den entsprechenden Aldehyden oxidiert, wobei NH_3 und H_2O_2 entsteht. Die Reaktion der Glutathion-Peroxidase mit H_2O_2 steigert die intrazelluläre GSSG-Bildung (S. 3) (Fig. 1).

b) t-Butylhydroperoxid stimuliert als Substrat der Glutathion-Peroxidase die intrazelluläre GSSG-Bildung (S. 3) (Fig. 1).

c) Nitrofurantoin, ein Antibiotikum zur Behandlung akuter Entzündungen der ableitenden Harnwege, sollte durch Redox-Zyklus (S. 4) und Hemmung der Glutathion-Reduktase (S. 3) den intrazellulären GSSG-Gehalt erhöhen (Fig. 1).

Nach 12 minütiger Infusion dieser Substanzen wurden die Versuche durch Frierstop der Leber zur Bestimmung intrazellulärer GSH- und und GSSG-Gehalte beendet.

3.1.1 Intrazelluläre Gehalte des oxidierten und reduzierten Glutathions

In den Kontrollbedingungen wurden nach früheren Ergebnissen vergleichbare GSH-Gehalte gefunden (8.5 µmol x g Leber^{-1}), während der GSSG-Gehalt um den Faktor 10 niedriger lag (1.2 nmol x g Leber^{-1}) (Tab. 1). Unter der Annahme, daß GSH und GSSG gleichmäßig im Wasserraum der Zelle verteilt sind, entspricht dies einer intrazellulären GSH-Konzentration von 10 mM, während die GSSG-Konzentration 22 µM betrug. Dies entspricht einem intrazellulären GSH/GSSG Konzentrationsverhältnis von 455. Zur Berechnung der intrazellulären Konzentration wurde ein intrazellulärer Wassergehalt von 0.55 ml x g Leber^{-1} angenommen (4). Möglicherweise fehler während der Präparation des Lebergewebes können ausgeschlossen werden, da zum Leberpulver im Überschuß vorgegebenes GSH nicht zur Erhöhung des intrazellulären GSSG-Gehalts führt (28) Tab. 1).

Monooxidierbare vergleichbare erhöhte GSSG-Gehalte wurden mit Benzylamin (0.5 mM) und Tryptamin (0.5 mM) gefunden (30 nmol x g Leber^{-1}), d.h. bei Verdoppelung der ungestörten Monoaminkonzentration (Benzylamin 1.0 mM, auf 64 nmol x g Leber^{-1} gesteigert wurden (Tab. 1). Der intrazelluläre Efflux von NH_2-Äquivalenten (Harnstoff und NH_3) ins Perfusat als Maß der Monoamin-Oxidation betrug für Benzylamin (0.5 mM, 0.54 ± 0.05, Tryptamin (0.5 mM, 0.48 ± 0.06 und Benzylamin (1.0 mM, 0.70 ± 0.05 µmol x min^{-1} x g Leber^{-1}. In Anwesenheit von Pargylin, dem Inhibitor der Monoamin-Oxidase, entsprachen intrazelluläre GSSG-Gehalte Kontrollwerten. Intrazelluläres GSH blieb jeweils unbeeinflußt.

Hydroxylamin (0.05 mM) und t-Butylhydroperoxid (0.05 und 0.1 mM) erhöhen ebenfalls den intrazellulären GSSG-Gehalt. Dies bedeutet, daß der in früheren Arbeiten beobachtete, gesteigerte GSSG-Efflux mit einer Erhöhung des intrazellulären GSSG-Gehalts einhergeht. Intrazelluläre GSH-Gehalte werden unter der beschriebenen Bedin-

Tabelle 1

Intrazelluläre Gehalte des oxidierten und reduzierten Glutathions in der perfundierten Rattenleber.

Die Bestimmung der intrazellulären GSH- und GSSG-Gehalte erfolgte nach 2.3, 2.6 und 2.7 . GSH und GSSG-Zugaben erfolgten aus Stammlösungen bekannter Konzentrationen. Bei den angegebenen Daten handelt es sich um Mittelwert $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes (n=4).

Bedingung		GSSG	GSH
		nmol x g Leber^{-1}	µmol x g Leber^{-1}
Kontrolle		18 $\pm$ 1	5.5 $\pm$ 0.2
plus GSH (5.3 µmol x g Leberpulver^{-1})		20 $\pm$ 1	NB [a]
plus GSSG (34 nmol x g Leberpulver^{-1})		50 $\pm$ 1	NB [a]
Tryptamin	(0.5 mM)	38 $\pm$ 3	6.0 $\pm$ 0.4
Benzylamin	(0.5 mM)	38 $\pm$ 8	6.5 $\pm$ 0.3
	(1.0 mM)	64 $\pm$ 9	5.4 $\pm$ 0.5
Benzylamin	(1.0 mM)		
plus Pargylin	(1.0 mM)	20 [b]	4.8 [b]
Pargylin	(1.0 mM)	22 [b]	6.4 [b]
t-Butylhydroperoxid	(0.05 mM)	63 $\pm$ 6	4.8 $\pm$ 0.7
t-Butylhydroperoxid	(0.10 mM)	206 $\pm$ 36	5.7 $\pm$ 0.3
Nitrofurantoin	(0.05 mM)	108 $\pm$ 5	4.8 $\pm$ 0.6

[a] nicht bestimmt

[b] Mittelwert aus zwei Experimenten

gungen durch Nitrofurantoin oder t-Butylhydroperoxid kaum beeinflußt (Tab. 1).

3.1.2. Glutathion-Efflux in die Galle

Die GSSG-Konzentration der Galle der in situ perfundierten Leber beträgt 0.3 mM, vergleichbar mit in vivo ermittelten Ergebnissen (67, 69) (Tab. 2). Die GSH-Konzentration beträgt 1.2 mM, unterliegt aber wesentlich größeren Schwankungen als die GSSG-Konzentration (Tab. 2).

Von Kaplowitz et al. (67) ermittelte GSH-Konzentrationen in vivo (3.4 mM) lagen jedoch erheblich höher als die durch Perfusion erlangten Werte. Letztere Autoren sammelten die Galle in m-Phosphorsäure, um einen weiteren Metabolismus des Glutathions unter ihren Versuchsbedingungen (Sammeln der Galle über 15 Minuten bei Raumtemperatur) zu vermeiden. Ferner zeigten sie, daß unter diesen Bedingungen eine erhebliche GSH-Autoxidation zu GSSG stattfindet. Um zu überprüfen, inwiefern Reaktionen in der Galle unter unseren Bedingungen (Sammeln bei $0^{\circ}C$, kurze Sammelperioden, schnelle Bestimmung des GSSG) von Bedeutung sind, wurde die GSH- und GSSG-Konzentration in Abhängigkeit zur Zeit nach der Probenentnahme bestimmt. Fig. 2a zeigt, daß bei $0^{\circ}C$ gesammelte Galleproben zu einem GSH-Verlust und GSSG-Anstieg führen, wenn sie nicht sofort analysiert werden. Die GSSG-Konzentration erhöhte sich in 10 Minuten von 0.38 auf 0.48 mM. Ansäuern der Galle ist also erforderlich, falls die Proben nicht sofort bestimmt werden können. Die Summe des oxidierten und reduzierten Glutathions nimmt ohne Ansäuern ebenfalls ab, möglicherweise durch Hydrolyse oder Transpeptidierung. Fig. 2b dagegen zeigt, daß auf das Ansäuern verzichtet werden kann, wenn die GSSG-Konzentration erhöht ist. In Anwesenheit von Benzylamin oder Nitrofurantoin ist die GSSG-Konzentration über einen Zeitraum von 20 Minuten

Tabelle 2

Glutathion-Konzentration in der Galle und biliärer Efflux

Glutathion wurde in Galleproben bestimmt, die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen erhalten wurden (intakter Kreislauf, Perfusion in situ, isoliert perfundierte Leber). Proben wurden bei 0°C gesammelt und sofort bestimmt, oder in 5% m-Phosphorsäure (67). Der Efflux in die Galle errechnete sich durch Multiplikation der Galle-Konzentration mit dem Gallefluß. Die Daten sind $\bar{x} \pm$ S.E.M. .

Versuchsbedingung	Proben-Behandlung	n	Galle-Konzentration		Biliärer Efflux		Literatur
			GSSG	GSH	GSSG	GSH	
			mM		nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$		
Anästhesierte Ratte,	0°C [a]	(8)	0.38±0.09	1.43±0.40	0.56±0.06	2.10±0.21	69
Kreislauf intakt	0°C	(7)	0.30±0.05	1.28±0.59	0.44±0.07	1.83±0.31	d
	m-Phosphorsäure	(?)	0.43±0.16	3.44±0.20	b	b	67
	m-Phosphorsäure	(6)	0.27±0.03	1.79±0.48	0.42±0.05	2.91±0.87	d
Perfusion in situ	0°C [a]	(4)	0.41±0.09	1.23±0.51	0.40±0.10	1.07±0.35	d
Isoliert perfundierte	0°C [a]	(10)	0.45±0.23	0.1 [c]	0.56±0.13	0.1	26, d
Leber	m-Phosphorsäure	(4)	0.41±0.09	0.1 [c]	0.34±0.06	0.1	d

[a] sofortige Bestimmung, [b] nicht bestimmt, [c] gelegentlich wurde GSH auch in der Galle der isoliert perfundierten Leber gefunden (bis 0.9 mM), [d] vorliegende Arbeit.

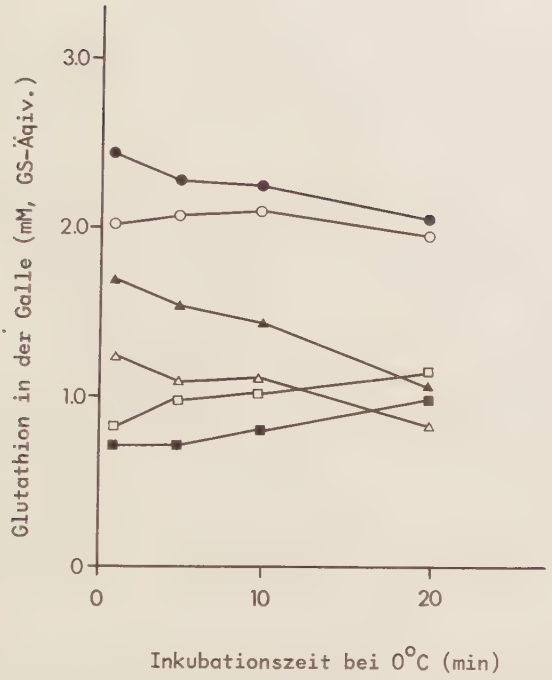

Fig. 2a

GSSG- und GSH-Konzentrationen in der Galle als Funktion der Zeit nach Sammeln bei 0°C.

Proben wurden von der in situ Leber erhalten, entweder bei intaktem Kreislauf (nicht perfundierend) (geschlossene Symbole) oder perfundierend (offene Symbole). Die Summe des oxidierten und reduzierten Glutathions (Kreise) zeigt, daß neben der GSSG-Bildung aus GSH ein Glutathion-Verlust besteht, der durch Hydrolyse oder Transpeptidierung erklärbar ist. GSSG ist durch die Quadrate, GSH durch die Dreiecke dargestellt.

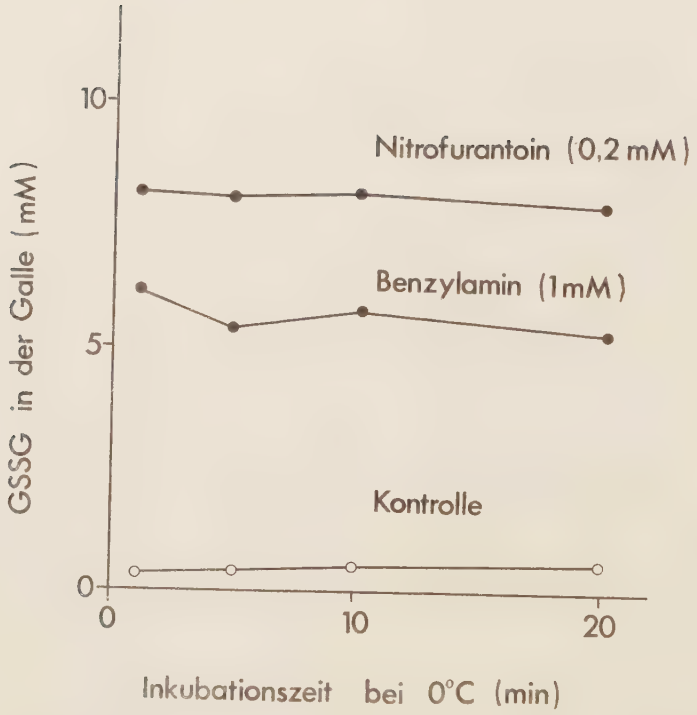

Fig. 2b

Zeitlicher Verlauf der unter oxidativen Bedingungen erhöhten GSSG-Konzentrationen in der Galle nach Sammeln bei 0°C (perfundierte Leber).

konstant, so daß hier die GSH-Autoxidation nicht von Bedeutung sein kann.

Während in der isoliert perfundierten Leber das gesamte Glutathion der Galle in der oxidierten Form vorliegt (26), besteht ein sehr variabler GSH-Efflux am in situ perfundierten Organ und nicht perfundierten Organ (Tab. 2). Der GSSG-Efflux war unter allen Bedingungen ähnlich und betrug 0.4-0.5 nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$ (Tab. 2).

GSSG-Efflux durch die sinusoidale Membran ins effluente Perfusat war unter Kontrollbedingungen nicht meßbar (0 in 6 Perfusionen). Dies wird in Fig. 3 gezeigt, wo ab der 30. Minute rezirkulierend perfundiert wurde. Unter dieser Bedingung kommt es zur Akkumulation des sinusoidal ausgeschiedenen reduzierten Glutathions. Die Oxidation von GSH zu GSSG während der Oxigenierung des Perfusats bei 37°C führt zu einem geringen Anstieg der Glutathiondisulfid-Konzentration. Einen ähnlichen Anstieg findet man in rezirkulierenden Perfusionen ohne Leber, in denen sinusoidaler GSH-Efflux durch Infusion vergleichbarer GSSG-Konzentrationen simuliert wurde (Fig. 3).

Der GSH-Efflux ins Perfusat der in situ perfundierten Leber betrug 14 ± 2 nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$ (n=32), ebenfalls vergleichbar mit früheren Arbeiten an der isoliert perfundierten Leber (70, 71).

3.1.3 Gesteigerter GSSG-Efflux in die Galle während der Metabolisierung von Hydroperoxiden

Wie Fig. 4 zeigt, führt die Infusion von Monoaminen zur gesteigerten GSSG-Ausscheidung in die Galle. Der Gallefluß selbst ist unbeeinflußt, so daß die erhöhte biliäre GSSG-Konzentration allein auf eine Steigerung des GSSG-Efflux zurückzuführen ist.

Fig. 5 zeigt die Beziehung zwischen Parametern intrazellulärer Hydroperoxid-Bildung und der GSSG-Ausscheidung in die Galle. Ein Maß für die intrazelluläre H_2O_2 - Produktion durch die Reaktion der

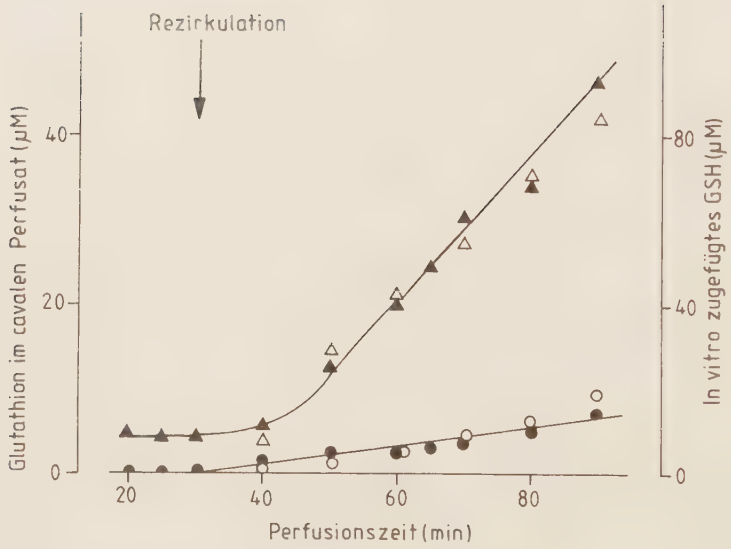

Fig. 3

Glutathion-Konzentration im effluenten Perfusat

Die Leber wurde anfangs nicht rezirkulierend, zur 30. Minute rezirkulierend perfundiert (Endvolumen 150 ml), so daß Glutathion akkumulierte. Die angegebenen Daten sind GSH-Äquivalente (GSH + 2 GSSG) (▲) und GSH- Äquivalente, vorliegend als GSSG (●). In einem weiteren Versuch wurde rezirkulierend ohne Leber perfundiert (offene Symbole). GSH, das weniger als 1% GSSG enthielt, wurde mit Infusionspumpen in das rezirkulierende System infundiert. Die GSSG-Konzentration war in beiden Versuchen ähnlich, wodurch gezeigt wird, daß GSSG-Efflux in das cavale Perfusat unter Kontrollbedingungen vernachlässigbar gering ist.

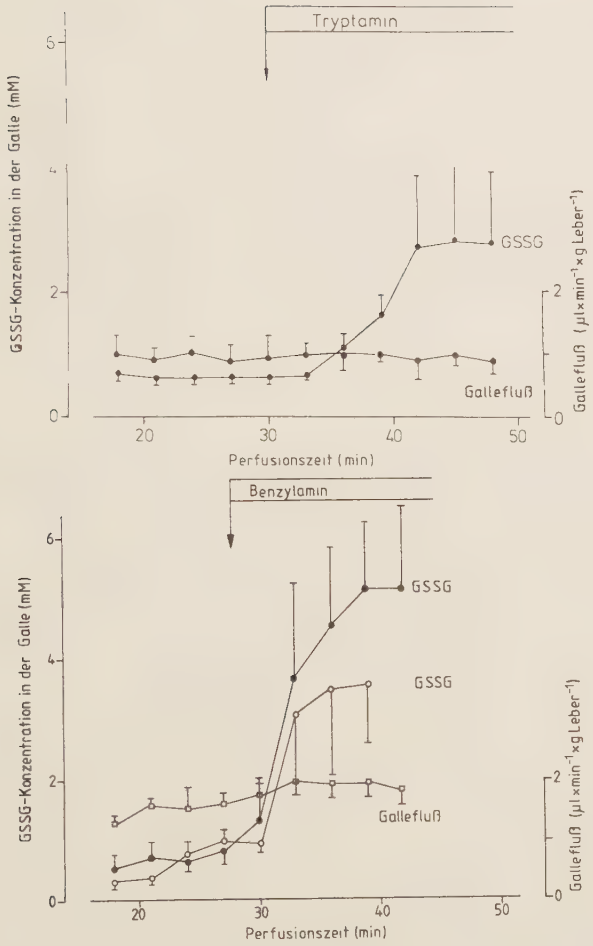

Fig. 4

Zeitverlauf der GSSG-Konzentration in der Galle von Lebern, die mit Tryptamin (0.5 mM) (oben) oder mit Benzylamin (unten) in Konzentrationen von 0.5 mM (O) und 1.0 mM (●) perfundiert wurden. Weiterhin wird der Gallefluß gezeigt. (n=4).

Monoamino-Oxidase ist der gesteigerte sinusoidale Efflux von NH_3-Äquivalenten (Harnstoff plus NH_3), während für t-Butylhydroperoxid die sinusoidale Aufnahme durch die Leber ein Maß für die intrazelluläre Präsenz von Hydroperoxiden darstellt. Diese Daten zeigen weiterhin die Beziehung zwischen Hydroperoxidumsatz durch die Glutathion-Peroxidase und dem GSSG-Efflux, die schon früher beschrieben wurde (18). Genaue Aussagen über die Stöchiometrie dieser Beziehung können jedoch nur durch weitere Untersuchungen erfolgen, die klären, inwiefern andere Wege des Monoamin- oder Hydroperoxid-Metabolismus bestehen.

3.1.4 Beziehung zwischen intrazellulärem GSSG-Gehalt und GSSG-Efflux in die Galle

Die Fig. 6 zeigt die Beziehung zwischen intrazellulären GSSG-Gehalten der Leber und der GSSG-Ausscheidung in die Galle unter verschiedenen Bedingungen. In Fig. 6a sind diese Bedingungen a) Kontrolle, b) Benzylamin (1.0 mM), c) Benzylamin (1.0 mM) plus Pargylin (1.0 mM), d) Pargylin (1.0 mM) als Kontrolle, e) Nitrofurantoin (0.05-0.15 mM) und in Fig. 6b Kontrollen und f) t-Butylhydroperoxid (0.03-0.10 mM). Die einzelnen Punkte sind jeweils verschiedene Leberperfusionen. Intrazelluläre GSSG-Gehalte bzw. Konzentrationen wurden durch Frierstop der Leber nach Erreichen einer konstanten biliären GSSG-Ausscheidung (steady state - Bedingung) (Fig. 4) bestimmt. Aus den Werten der Fig. 6 errechnete sich an der kanalikulären Membran ein Konzentrationsgradient von 47 ± 4 . Auffällig sind die Unterschiede von Fig. 6a und 6b. Während für Benzylamin und Nitrofurantoin die gleiche Ausscheidungscharakteristik besteht, wird mit t-Butylhydroperoxid bei vergleichbaren intrazellulären Konzentrationen weniger GSSG in die Galle ausgeschieden. Während der Infusion besteht im Gegensatz zum Benzylamin ein hoher

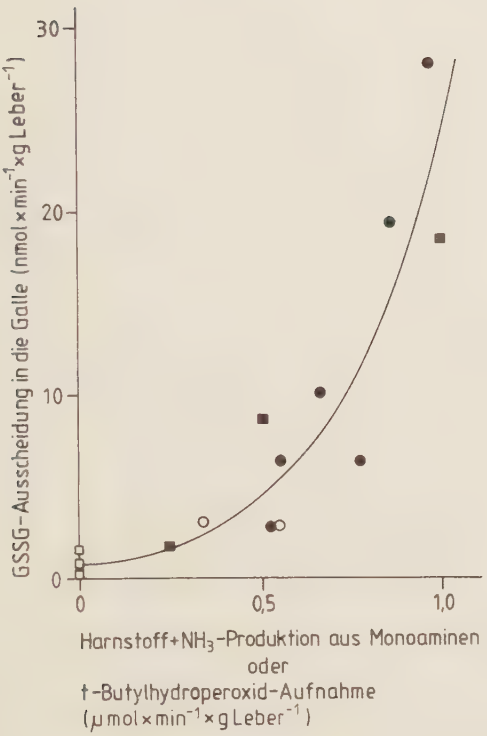

Fig. 5

Beziehung zwischen GSSG-Efflux in die Galle und der Bildung von NH_3-Äquivalenten (NH_3 + Harnstoff) aus Monoaminen (Benzylamin, ● ; Tryptamin, ○) oder der sinusoidalen Aufnahme von t-Butylhydroperoxid, ■ . Kontrollen, □ .

Fig. 6a

Fig. 6b

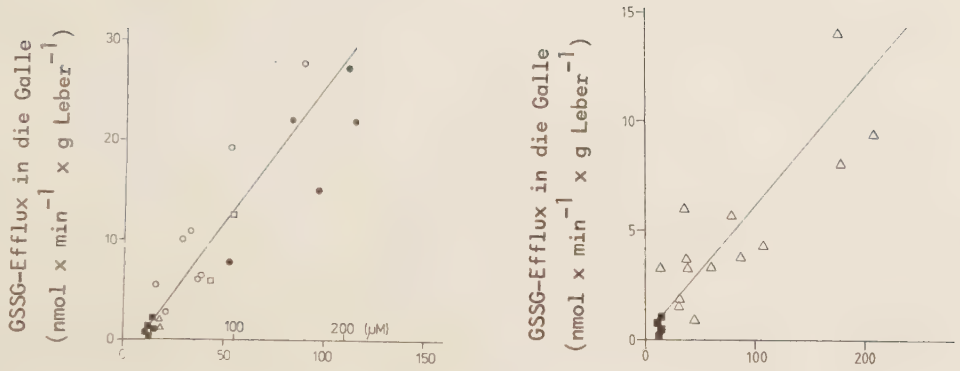

Fig. 6

Beziehung zwischen GSSG-Efflux in die Galle und dem intrazellulären GSSG-Gehalt

Symbole der Fig. 6a sind: Kontrollen, ■ ; Benzylamin (1.0 mM), ○ ; Benzylamin plus Pargylin (1.0 mM), △ ; Pargylin (1.0 mM), ▲ ; Nitrofurantoin, (0.05-0.15 mM), ●. Symbole der Fig. 6b sind: Kontrollen, ■ ; t-Butylhydroperoxid (0.03-0.10 mM), △. Die einzelnen Punkte sind jeweils verschiedene Leberperfusionen.

sinusoidaler GSSG-Efflux, der von der angebotenen Hydroperoxid-Konzentration abhängig ist. Die Summe von sinusoidalem und biliärem GSSG-Efflux ergibt wiederum die Beziehung in Fig. 6a.
Es besteht somit eine Aufteilung der GSSG-Ausscheidung während der Infusion von t-Butylhydroperoxid, die möglicherweise durch die Toxizität dieser Substanz erklärbar ist (Bildung von Peroxy-Radikalen) (72). LDH-Aktivität im effluenten Perfusat war in der Periode der Zugabe nicht erhöht, jedoch war der Gallefluß unterschiedlich stark gesenkt.
Mit Nitrofyrantoin konnten keine direkten GSSG-Bestimmungen des Perfusats durchgeführt werden (spontane Reaktion des Nitrofurantoin mit NADPH und Hemmung der Glutathion-Reduktase).

Ein Kriterium des trägervermittelten Transports ist das Transportmaximum, das in den Fig. 6a und 6b noch nicht erreicht ist. Zur weiteren Steigerung der GSSG-Ausscheidung mit dem Ziel, ein biliäres Transportmaximum zu erreichen, wurde Benzylamin (1.0 mM) gemeinsam mit Nitrofurantoin (0.15 mM) infundiert. Fig. 7 zeigt, daß der GSSG-Efflux in die Galle unter diesen Bedingungen bei stark erhöhtem Gallefluß bis auf ca. 100 nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$ gesteigert werden kann, jedoch nach kurzer Zeit wieder abfällt. Frierstops der Leber ergaben zur 35. Min. einen intrazellulären GSSG-Gehalt von 359 $\pm$ 45 nmol x g $Leber^{-1}$, zur 40. Min. einen Gehalt von 300 $\pm$ 20. Zur 40. Min. ist aber der GSSG-Efflux bereits um mehr als 60% reduziert, während der intrazelluläre Gehalt nahezu konstant geblieben ist. Man kann unter diesen Bedingungen somit keine Beziehung wie in der Fig. 6 herstellen, da keine steady state - Bedingungen der GSSG-Ausscheidung bestehen, möglicherweise Ausdruck einer zu toxischen Stoffwechsellage, durch die ein biliäres Transportmaximum vorgetäuscht werden kann.

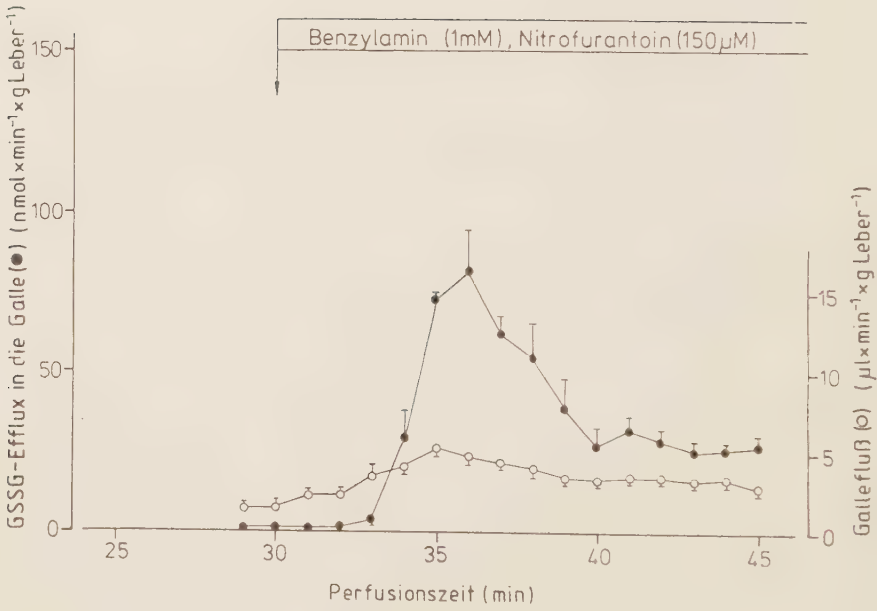

Fig. 7

Zeitlicher Verlauf der GSSG-Ausscheidung in die Galle (●) bei Infusion von Benzylamin (1.0 mM) plus Nitrofurantoin (0.15 mM). Weiterhin ist der während der Zugaben stimulierte Gallefluß (○) dargestellt. n=4.

3.2 Kompetition zwischen Glutathiondisulfid- und Glutathion S-Konjugat-Transport in die Galle der perfundierten Rattenleber

Der in 3.1 berechnete GSSG-Konzentrationsgradient an der kanalikulären Membran ist bisher nur ein Hinweis für die Existenz eines aktiven GSSG-Transportsystems. Die methodischen Schwierigkeiten zur Bestimmung eines Transportmaximums führten zu den folgenden Untersuchungen, die Hemmbarkeit des GSSG-Transportsystems als weiteres Kriterium des trägervermittelten Transports nachzuweisen.

Die Annahme, daß Glutathiondisulfid als "Homokonjugat des Glutathions" ähnlich den S-Konjugaten in die Galle ausgeschieden wird (73), war Anlaß, die Beeinflussung des stimulierten GSSG-Transports durch Glutathion S-Konjugate, bzw. umgekehrt, die Beeinflussung der S-Konjugat-Ausscheidung durch GSSG zu untersuchen. Zur Stimulation des biliären GSSG-Transports wurden Hydroperoxide und Nitrofurantoin infundiert. Stimulation der S-Konjugat-Ausscheidung erfolgte durch Substrate der Glutathion S-Transferasen, 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB) (41, 55, 74) oder direkt durch Infusion von synthetisiertem und gereinigtem Sulfobromophthalein S-glutathion (59).

Weiterhin wurde die Beziehung zwischen GSSG-Efflux in die Galle und dem intrazellulären GSSG-Gehalt der Leber mit Menadion untersucht, das durch Redox-Zyklus (75) zur gesteigerten GSSG-Bildung führt (76), aber auch mit GSH (36) und Glucuronsäure (77) konjugiert werden kann. Die biliäre Ausscheidung als Glucuronid ist nachgewiesen (77), während die intrazelluläre S-Konjugation und biliäre S-Konjugat-Ausscheidung wahrscheinlich ist, da Menadion mit GSH in vitro spontan reagiert (36, 78). Diese Reaktion wird in Anwesenheit von S-Transferase-Aktivität gesteigert (36).

3.2.1 Reduzierter GSSG-Transport in die Galle während der biliären S-Konjugat-Ausscheidung

Die biliäre GSSG-Ausscheidung wird durch t-Butylhydroperoxid (30 µM) mehrfach gesteigert und bleibt über 30 Minuten konstant (Fig. 8b). In Fig. 8a wurde CDNB (30 µM) über 5 Minuten infundiert, was zur Abnahme des biliären GSSG-Transports während der S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion-Ausscheidung führt. Der Gallefluß war während der S-Konjugat-Ausscheidung leicht erhöht.

Auf Grund der folgenden Beobachtungen besteht Kompetition zwischen GSSG- und S-Konjugat-Transport:

a) In Fig. 8b bestehen steady state Bedingungen der biliären GSSG-Ausscheidung in Abwesenheit von CDNB.

b) Die verminderte GSSG-Ausscheidung ist reversibel und somit nicht durch S-Konjugat-Bildung bedingte GSH-Verarmung oder Schäden des Transportsystems zu erklären.

c) Abnahme des GSSG-Transports wird ebenfalls beobachtet, wenn die Stimulation der GSSG-Ausscheidung mit Nitrofurantoin erfolgt (Fig. 9).

d) Der GSSG-Efflux wird vermindert, wenn die Stimulation der S-Konjugat-Ausscheidung direkt durch Infusion eines S-Konjugats erfolgt (Fig. 10). Die Reduktion des GSSG-Transports ist somit allein durch gesteigerte S-Konjugat-Ausscheidung möglich, da in diesem Versuch hemmende Einflüsse durch elektrophile Vorstufen (CDNB, BSP) ausgeschlossen werden können.

3.2.2 Der intrazelluläre GSSG-Gehalt während der S-Konjugat-Ausscheidung in Anwesenheit von t-Butylhydroperoxid und Nitrofurantoin

Daß die verminderte biliäre GSSG-Ausscheidung während der stimulierten S-Konjugat-Ausscheidung nicht durch Reduktion der intra-

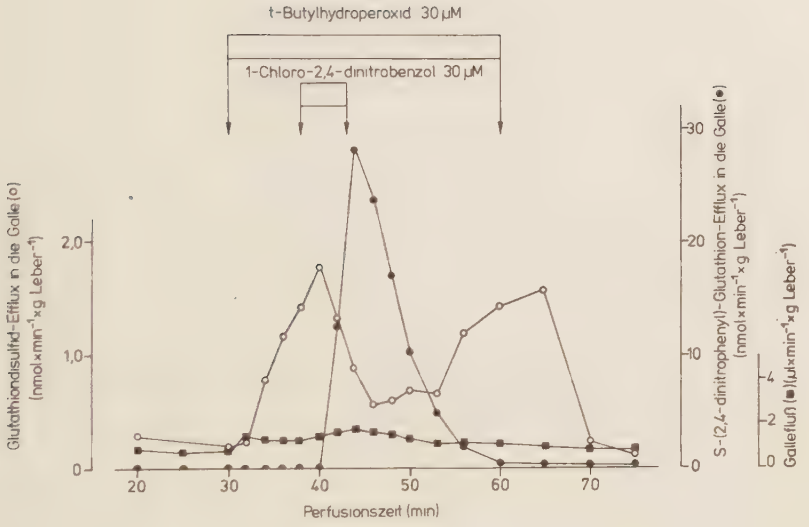

Fig. 8a

Gallefluß (■) und Efflux von Glutathiondisulfid (O) und

S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion (●) in die Galle.

GSSG-Efflux wurde durch Infusion von t-Butylhydroperoxid stimuliert, Glutathion S-Konjugat-Efflux durch 5 minütige Infusion von 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (CDNB).

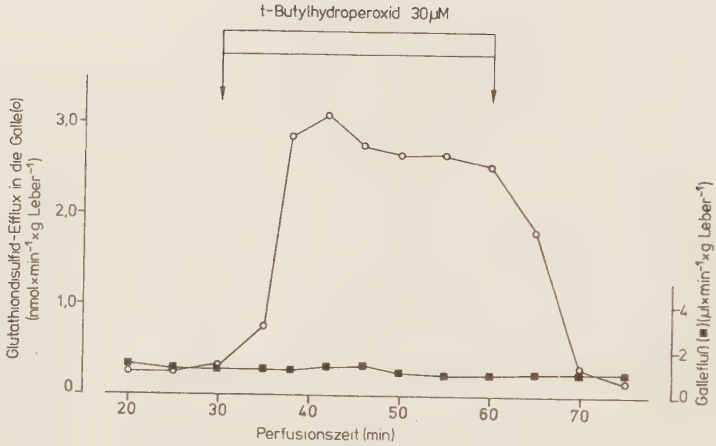

Fig. 8b

Gallefluß (■) und biliäre Ausscheidung von Glutathiondisulfid (○) in Anwesenheit von t-Butylhydroperoxid.

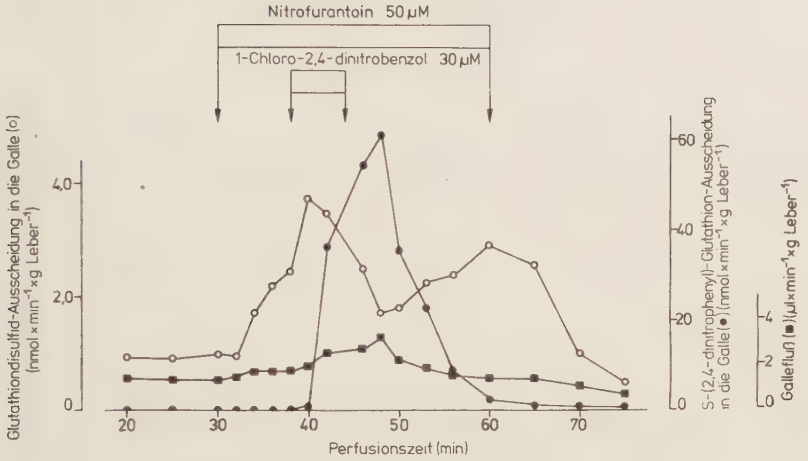

Fig. 9

Gallefluß (■) und biliärer Efflux von Glutathiondisulfid (○) und S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion (●).

Der GSSG-Efflux wurde durch Nitrofurantoin (50 µM) stimuliert.

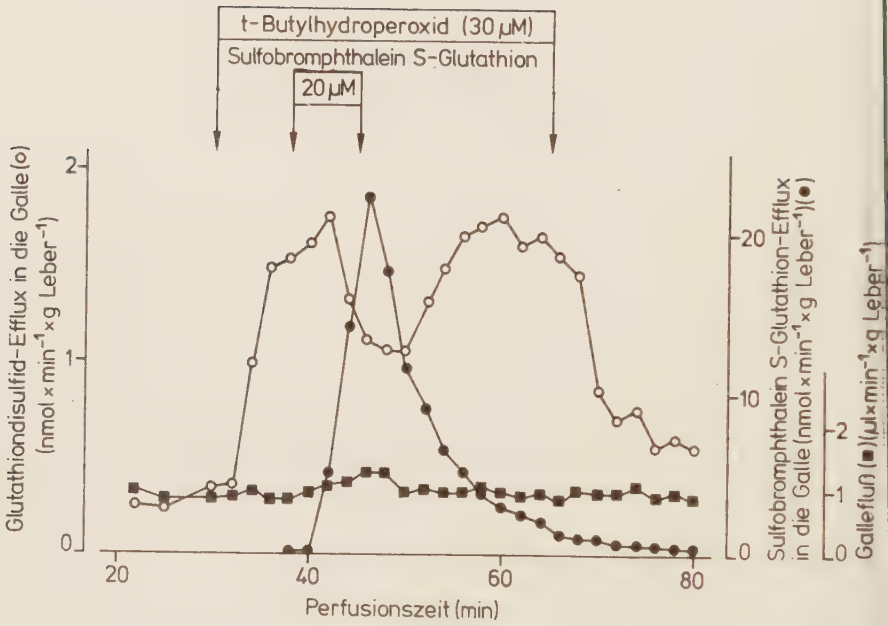

Fig. 10

Gallefluß (■) und biliärer Efflux von Glutathiondisulfid (O)

und Sulfobromophthalein S-glutathion (●).

Der GSSG-Efflux wurde durch Infusion von t-Butylhydroperoxid stimuliert, der S-Konjugat-Efflux durch 5 minütige Infusion von Sulfobromophthalein S-glutathion.

zellulären GSSG-Bildung bedingt ist, wird durch Fig. 11 gezeigt. Anwesenheit von CDNB inhibiert die biliäre GSSG-Ausscheidung bei vergleichbaren intrazellulären GSSG-Gehalten. Diese inhibierte Beziehung erhält man mit t-Butylhydroperoxid (Fig. 11a), Nitrofurantoin (Fig. 11b) und Benzylamin. Letztere Beziehung wird nicht gezeigt.

3.2.3 Beziehung zwischen GSSG-Efflux in die Galle und intrazellulärem GSSG-Gehalt in Anwesenheit von Menadion

Fig. 12 zeigt, daß Menadion den intrazellulären GSSG-Gehalt der Leber mehrfach erhöht, während der GSSG-Efflux in die Galle erniedrigt ist. Menadion mit Nitrofurantoin gemeinsam infundiert führt ebenso zur inhibierten Beziehung. Möglicherweise ist für diese Hemmung ein stimulierter S-Konjugat-Transport verantwortlich. Da Menadion nach Losito et al. (77) hauptsächlich als Glucuronid ausgeschieden wird, könnten auch letztere die Inhibierung verursachen.

3.2.4 Inhibierung des S-Konjugat-Transports in die Galle während stimulierter GSSG-Ausscheidung

Der zu Fig. 8a umgekehrte Versuch zeigt die Inhibierung des S-Konjugat-Transports während des durch t-Butylhydroperoxid gesteigerten GSSG-Effluxes (Fig. 13). Die CDNB-Konzentration wurde in diesem Versuch niedrig (2 µM), die Hydroperoxid-Konzentration dagegen hoch gewählt (250 µM). In ähnlichen Experimenten mit niedrigen Hydroperoxid-Konzentrationen (30 µM) wurde nur eine geringe Inhibierung der S-Konjugat-Ausscheidung beobachtet. Eine Erklärung hierfür wäre, daß das S-Konjugat effektiver ausgeschieden wird und wahrscheinlich einen niedrigeren K_i-Wert besitzt als GSSG für den S-Konjugat-Transport.

Fig. 11a

Fig. 11b

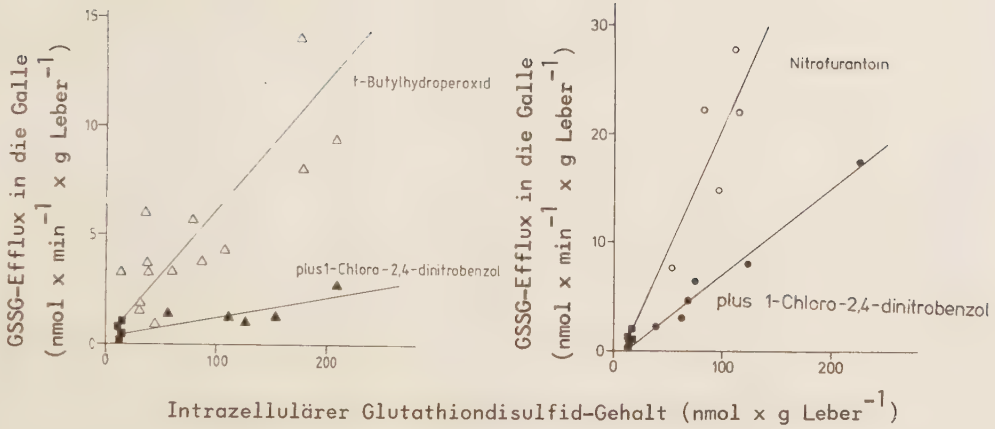

Fig. 11

Beziehung zwischen GSSG-Efflux in die Galle und intrazellulärem GSSG-Gehalt in Anwesenheit und Abwesenheit von CDNB (30 µM; Zugabe zur 38. Minute, Frierstop zur 43. Minute).

GSSG-Efflux wurde durch t-Butylhydroperoxid (Fig. 11a) oder Nitrofurantoin (Fig. 11b) stimuliert. Jeder Punkt stellt einen Versuch dar. Die Symbole sind: Kontrollen, ■; t-Butylhydroperoxid (30-100 µM), △; t-Butylhydroperoxid (30-100 µM) plus CDNB (30 µM), ▲; Nitrofurantoin (50-150 µM) plus CDNB (30 µM), ●; Nitrofurantoin (50-150 µM), ○.

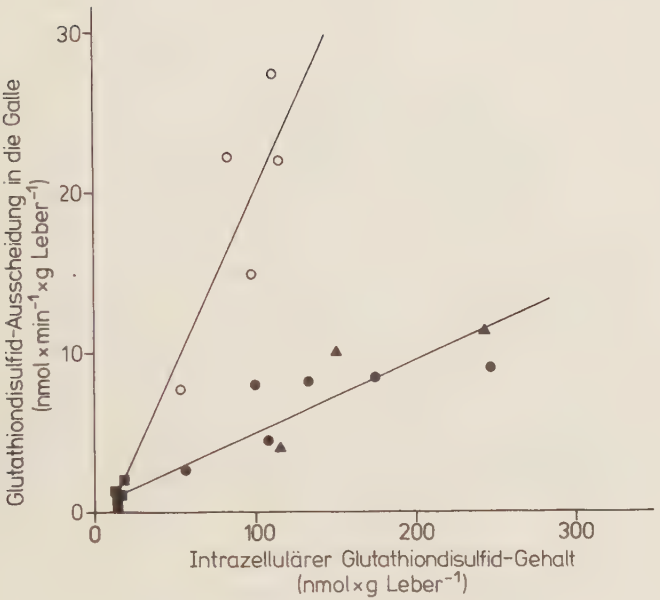

Fig. 12

Beziehung zwischen GSSG-Efflux in die Galle und intrazellulärem GSSG-Gehalt in Anwesenheit und Abwesenheit von Menadion (50 µM).

Die Zugaben von Nitrofurantoin und Menadion erfolgten von der 30.-42. Minute der Leberperfusion, die zur 42. Minute durch Frierstop beendet wurde. Die Symbole sind: Kontrollen, ■; Nitrofurantoin (50-150 µM), ○; Menadion (50 µM), ●; Nitrofurantoin (50 µM) plus Menadion (50 µM), ▲.

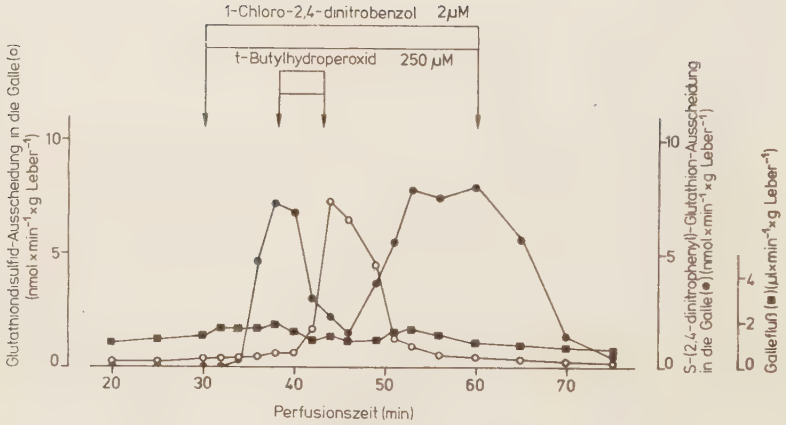

Fig. 13

Beeinflussung der biliären S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion-Ausscheidung (●) während der durch t-Butylhydroperoxid stimulierten GSSG-Ausscheidung (o).

Fig. 14 zeigt, daß die Inhibierung des biliären S-Konjugat-Transports auf den gesteigerten GSSG-Efflux zurückzuführen ist und nicht die Folge einer Schädigung biliärer Transportsysteme durch Hydroperoxide widerspiegelt.

In Fig. 14a kommt es während des H_2O_2 - stimulierten GSSG-Effluxes zur Hemmung der biliären S-Konjugat-Ausscheidung, die reversibel ist. Fig. 14b zeigt, daß in gleichen Versuchen mit Lebern von Ratten, die über 4 Wochen selenfreies Futter bekamen, der biliäre GSSG-Efflux durch H_2O_2 nicht stimuliert ist, da in diesen Lebern die H_2O_2 - metabolisierende, selenabhängige Glutathion-Peroxidase-Aktivität weniger als 3% der Kontrollaktivität beträgt (14). Unter diesen Bedingungen besteht keine Hemmung der S-Konjugat-Ausscheidung in Anwesenheit von H_2O_2. Somit ist für die Inhibierung der S-Konjugat-Ausscheidung die gesteigerte intrazelluläre Bildung und stimulierte Ausscheidung von Glutathiondisulfid verantwortlich.

Inhibierung der S-Transferasen durch GSSG als Erklärung für die verminderte S-Konjugat-Ausscheidung ist unwahrscheinlich, da in Versuchen mit Leberhomogenaten die CDNB-Konjugation erst bei sehr hohen GSSG-Konzentrationen (2-3 mM) um etwa 30% reduziert wird. Derart hohe Konzentrationen werden intrazellulär nicht erreicht.

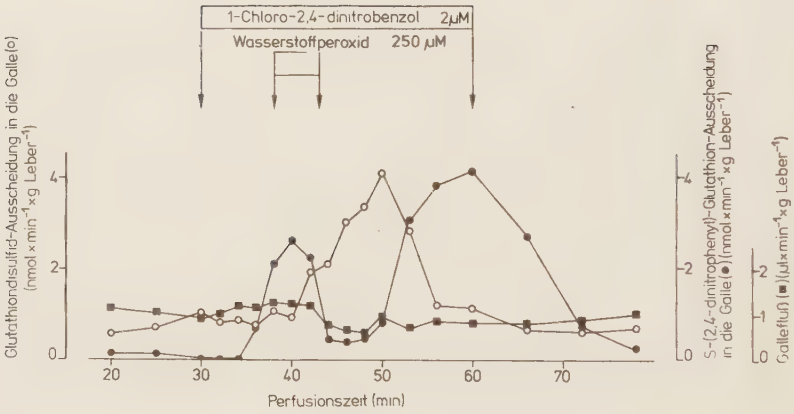

Fig. 14a

Inhibierung der biliären S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion-Ausscheidung (●) während der gesteigerten GSSG-Ausscheidung (○) durch H_2O_2.

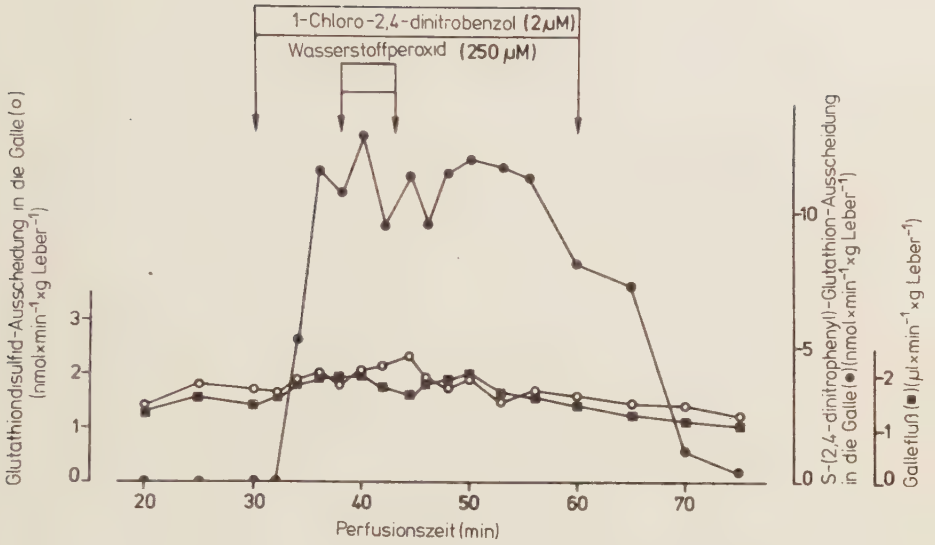

Fig. 14b

Der zu Fig. 14a identische Versuch mit Lebern von Ratten, die über 4 Wochen selenfreies Futter bekamen.

Hier führt H_2O_2 nicht zur Stimulation der biliären GSSG-Ausscheidung, da die H_2O_2 - metabolisierende, selenabhängige Glutathion-Peroxidase fehlt (3% der Kontrollaktivität). Symbole wie in Fig. 14a.

3.3 Inhibierung der Glutathion-Reduktase durch Glutathion S-Konjugate

Wie in 3.2 beschrieben, hemmen Substrate der GSH S-Transferasen oder S-Konjugate den stimulierten biliären GSSG-Efflux. Im folgenden wird die exzessive Zunahme des intrazellulären GSSG unter diesen Bedingungen gezeigt, die nicht allein durch Hemmung des kanalikulären GSSG-Transports erklärbar ist. Die Möglichkeit, daß Hemmung der GSSG-Reduktase durch S-Konjugate oder deren elektrophilen Vorstufen bei gleichzeitiger Hemmung der biliären GSSG-Ausscheidung für die exzessive intrazelluläre GSSG-Akkumulation verantwortlich ist, wurde an Leberhomogenaten und der gereinigten GSSG-Reduktase menschlicher Erythrozyten (79) untersucht, deren Sequenz (80) und kristallographische Struktur (81) bekannt ist. Besonders bedeutsam erschien die Möglichkeit, daß S-Konjugate, ähnlich wie GSSG, mit ihrem Glutathion-Anteil am aktiven Zentrum des Enzyms binden.

Zur Klärung des Inhibitionstyps wurden enzymkinetische Untersuchungen mit menschlicher GSSG-Reduktase, gereinigten S-Konjugaten (S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion, Sulfobromophthalein S-glutathion) und deren elektrophilen Vorstufen (CDNB, BSP) durchgeführt und mit der Bindung des S-Konjugats S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion am Enzym im kristallographischen Bild verglichen (82).

3.3.1 Exzessive GSSG-Akkumulation in der Rattenleber während der Inhibierung des biliären GSSG-Transports

Wie in Tab. 3 gezeigt wird, führt die Infusion von Benzylamin, t-BOOH und Nitrofurantoin zur Erhöhung des intrazellulären GSSG-Gehalts. Die zusätzliche Infusion von CDNB führt zu einem weiteren Anstieg des GSSG-Gehalts mit Benzylamin und t-BOOH, während dieser mit Nitrofurantoin nicht besteht. Wie in 3.2 schon gezeigt wurde,

Tabelle 3

Intrazellulärer GSSG-Gehalt der perfundierten Rattenleber unter oxidativen Bedingungen und die intrazelluläre Akkumulation von GSSG in Anwesenheit von CDNB.

Versuchsbedingung	GSSG-Gehalt der Leber	GSSG-Akkumulation durch CDNB	GSSG-Akkumulation durch den inhibierten GSSG-Transport[a]	Exzessive GSSG-Akkumulation[b]
		nmol x g Leber^{-1}		
Benzylamin (1.0 mM)(n=11)	56 ± 8	----	----	----
plus CDNB (30 µM)(n=6)	109 ± 16	53	8.6 ± 1.7	44
t- BOOH (30 µM)(n=6)	40 ± 9	----	----	----
plus CDNB (30 µM)(n=4)	91 ± 16	51	3.0 ± 0.4	48
Nitrofurantoin (50 µM)(n=5)	74 ± 19	----	----	----
plus CDNB (30 µM)(n=5)	74 ± 12	----	4.7 ± 0.3	----

[a] Berechnet aus dem reduzierten biliären GSSG-Efflux zwischen der 38. und 43. Minute (siehe Fig. 8a u. 9).

[b] Berechnet aus der Differenz der intrazellulären GSSG-Gehalte mit und ohne CDNB minus der GSSG-Akkumulation durch Hemmung des biliären GSSG-Transports.

ist der biliäre GSSG-Efflux in Anwesenheit von CDNB reduziert. Während der Abfall des biliären GSSG-Effluxes den geringen Anstieg des intrazellulären GSSG mit Nitrofurantoin und CDNB erklärt, kann dieser aber nicht die Ursache der exzessiven GSSG-Akkumulation mit Benzylamin und t-Butylhydroperoxid in Anwesenheit von CDNB sein. Eine mögliche Erklärung für diese Akkumulation im Überschuß ist die Hemmung der GSSG-Reduktase während der Infusion von CDNB. Ein wichtiges Argument für diese Annahme ist die fehlende Akkumulation mit Nitrofurantoin, einem Inhibitor der GSSG-Reduktase (65). Da die intrazelluläre Konzentration des CDNB wegen der hohen S-Transferase-Aktivität von 120 U x g Leber^{-1} (41) wahrscheinlich sehr gering ist und somit S-Konjugate für die Inhibierung des Enzyms verantwortlich wären, wurden enzymkinetische Untersuchungen bevorzugt mit letzteren durchgeführt.

3.3.2 Inhibierung der Glutathion-Reduktase der Rattenleber durch Glutathion S-Konjugate

Die GSSG-Reduktase-Aktivität der Rattenleber betrug 8 U x g Leber^{-1}, in Übereinstimmung mit (83).
S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion und Sulfobromophthalein S-glutathion im Testansatz führten zur Inhibierung der GSSG-Reduktase, die in Fig. 15 dargestellt ist. Somit kann die Inhibierung der Glutathion-Reduktase für die intrazelluläre Erhöhung des Glutathiondisulfids (Tab. 3) verantwortlich sein. Durch Verfolgen der NADPH-Oxidation über einen längeren Zeitraum wurde eine Reaktivierung des gehemmten Tests beobachtet, die wahrscheinlich durch weiteren Metabolismus der S-Konjugate durch das Leber-Extrakt bedingt ist (57). Versuche mit den elektrophilen Vorstufen der S-Konjugate (CDNB, BSP) wurden wegen der hohen S-Transferase-Aktivität und GSH-Konzentrationen in Leber-Extrakten nicht durchgeführt.

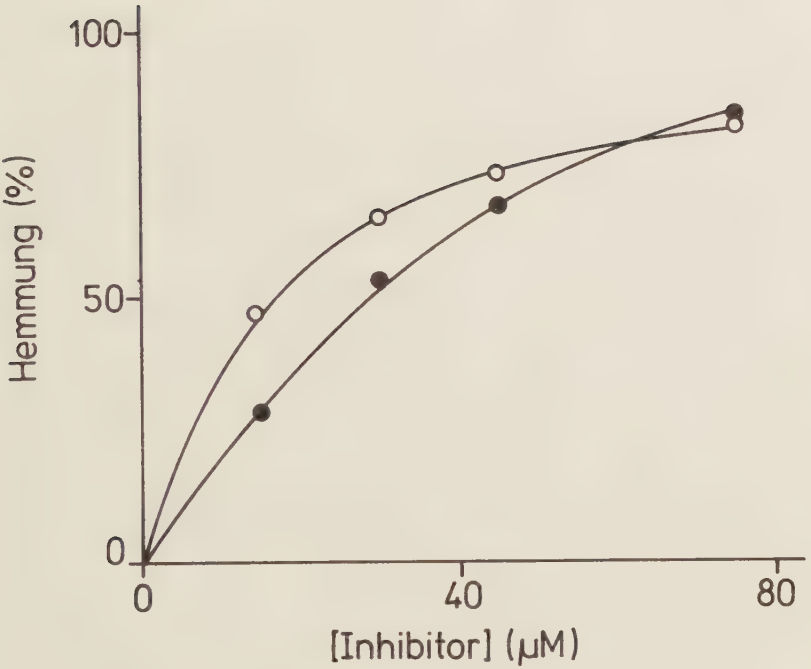

Fig. 15

Inhibierung der GSSG-Reduktase im Rattenleberhomogenat durch S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion (●) und Sulfobromophthalein S-glutathion (○) in vitro.

Die Präparation des Homogenats erfolgte wie unter 2.15 beschrieben.

3.3.3 Enzymkinetische Untersuchung der Inhibierung menschlicher GSSG-Reduktase durch Glutathion S-Konjugate und ihren elektrophilen Vorstufen

Fig. 16a zeigt unkompetitive Hemmung der Glutathion-Reduktase menschlicher Erythrozyten durch CDNB. K_i, die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes ESI, beträgt 22 µM. Das Lineweaver-Burk-Diagramm in Fig. 16a führt zu der Schlußfolgerung, daß CDNB nicht an das freie reduzierte Enzym, sondern an einem intermediären Enzymzustand während der Katalyse unter Bildung eines dead-end-Komplexes bindet. Nach längerer Inkubation des Testansatzes mit CDNB war die Enzymhemmung irreversibel. In einem typischen Experiment (50 ng Enzym/ml, 200 µM GSSG, 100 µM NADPH) wurde die Aktivität des Enzyms durch CDNB (50 µM) auf 25% der ursprünglichen Aktivität reduziert. Nach 30 minütiger Inkubation des Testansatzes und anschließender 24 stündiger Dialyse gegen Testpuffer konnte lediglich eine Reaktivation des gehemmten Enzyms bis 60% der ursprünglichen Aktivität erreicht werden.

Fig. 16b zeigt die nicht-lineare Beziehung zwischen 1/v und der S-Konjugat-Konzentration im Dixon-Diagramm. Eine solche parabolische Inhibierung besteht dann, wenn wenigstens 2 Inhibitormoleküle derart am Enzym binden, daß $E(I)^n$-oder $ES(I)^n$-Komplexe entstehen (62). Der in Fig. 16b verwendete Thioether kann somit an weiteren Enzympositionen binden, wenn EI oder ESI-Komplexe gebildet sind. Die Inhibierungskonstante beträgt 30 µM.

Da kristallographische Studien mit S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion in Anwesenheit von $(NH_4)_2SO_4$ (2 M) durchgeführt wurden (82), erfolgte die enzymkinetische Untersuchung der Enzymhemmung ebenfalls unter diesen Bedingungen.

In Anwesenheit von 2 M Ammoniumsulfat ist S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion ein kompetitiver Inhibitor der GSSG-Reduktase (82).

Im Gegensatz hierzu wurde unter obigen Bedingungen bei geringer

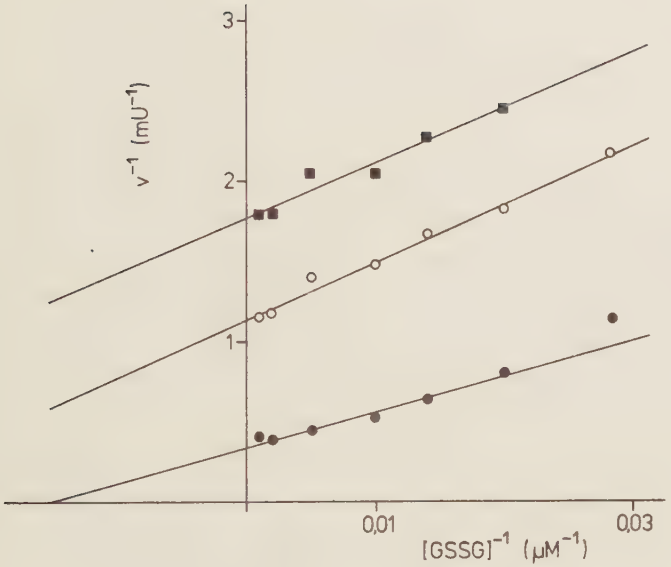

Fig. 16a

Lineweaver-Burk-Diagramm der GSSG-Reduktion in Anwesenheit von CDNB.
Symbole: Kontrolle, ● ; CDNB (50 µM), ○ ; CDNB (100 µM), ■ .

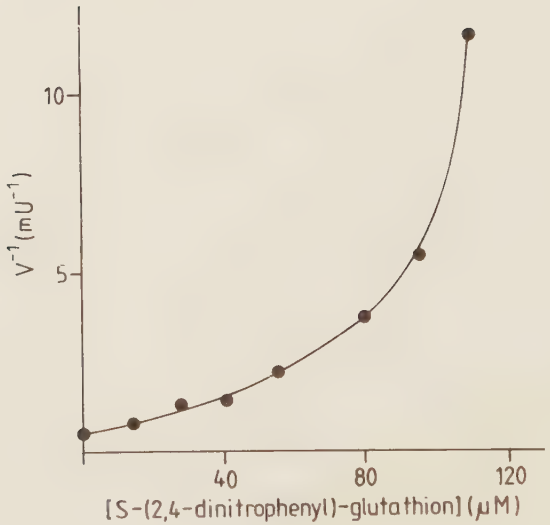

Fig. 16b

Dixon-Diagramm der GSSG-Reduktion in Anwesenheit von S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion.

Ionenstärke im Lineweaver-Burk-Diagramm nicht-kompetitive Hemmung gefunden (wird nicht gezeigt). Somit kann die Ionenstärke zu Änderungen im Inhibitionstyp führen.

Die mit S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion beobachtete Inhibierung der GSSG-Reduktase war nach 24 stündiger Dialyse gegen Testpuffer völlig reversibel. Offensichtlich schützt S-Konjugation vor irreversibler Enzymhemmung.

In Übereinstimmung mit den in 2 M Ammoniumsulfat erhobenen enzymkinetischen Daten zeigt die röntgenkristallographische Untersuchung der mit S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion getränkten, kristallinen GSSG-Reduktase Bindung des Inhibitors am aktiven Zentrum in nur einer Position (82). Die γ-Glutamylgruppe des S-Konjugates bindet an der γ-Glutamylposition von Glutathion-I, während der Glycylarm neben dem γ-Glutamylarm von Glutathion-II des Glutathiondisulfids bindet (82).

Sulfobromophthalein und sein S-Konjugat hemmen die Glutathion-Reduktase nicht-kompetitiv (Fig. 17a und 17b). Sowohl die Michaelis-Konstante als auch V_{max} sind durch die Bindung der Inhibitoren beeinflußt.

Der durch BSP gehemmte Test war nach Zufügen von Albumin (0.2%) zur Testlösung vollständig reversibel, bedingt durch die Bindung des BSP an Albumin. Der durch das S-Konjugat gehemmte Test war nur nach Verdünnen oder 24 stündiger Dialyse gegen Testpuffer reversibel. Offensichtlich verliert BSP nach S-Konjugation seine Albuminaffinität.

Fig. 18 zeigt, daß BSP bzw. sein S-Konjugat auf Grund der linearen Beziehung im Dixon-Diagramm an nur einer Enzymposition binden, ferner, daß Sulfobromophthalein S-glutathion stärker hemmt als BSP. Die Inhibitionskonstanten für BSP und sein S-Konjugat betragen 25 µM und 18 µM.

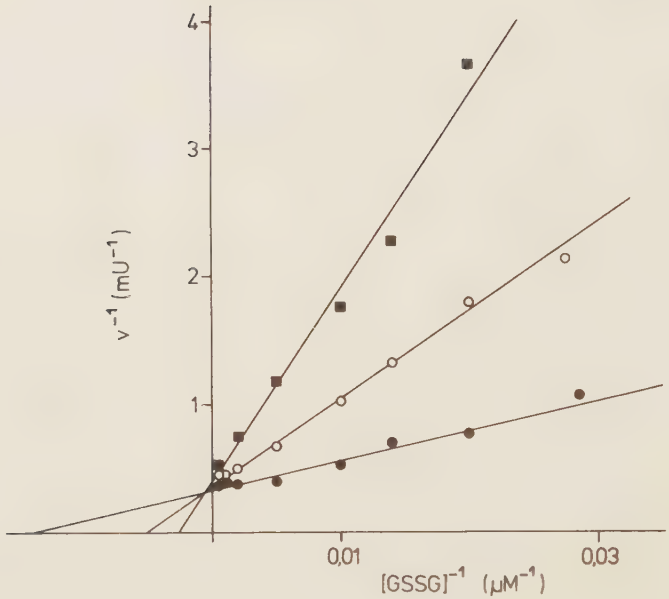

Fig. 17a

Lineweaver-Burk-Diagramm der GSSG-Reduktion in Anwesenheit von Sulfobromophthalein.

Symbole: Kontrolle, ●; Sulfobromophthalein (50 µM), ○; Sulfobromophthalein (100 µM), ■.

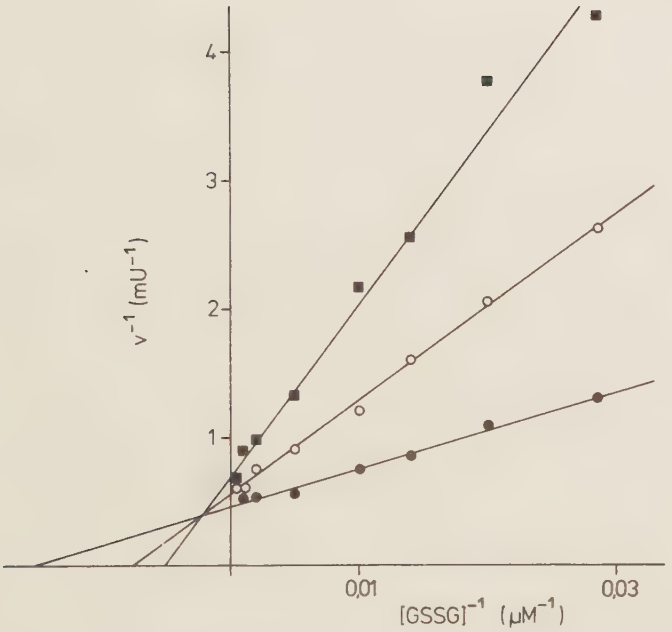

Fig. 17b

Lineweaver-Burk-Diagramm der GSSG-Reduktion in Anwesenheit von Sulfobromophthalein S-glutathion.

Symbole: Kontrolle, ●; Sulfobromophthalein S-glutathion (30 µM), ○; Sulfobromophthalein S-glutathion (60 µM), ■.

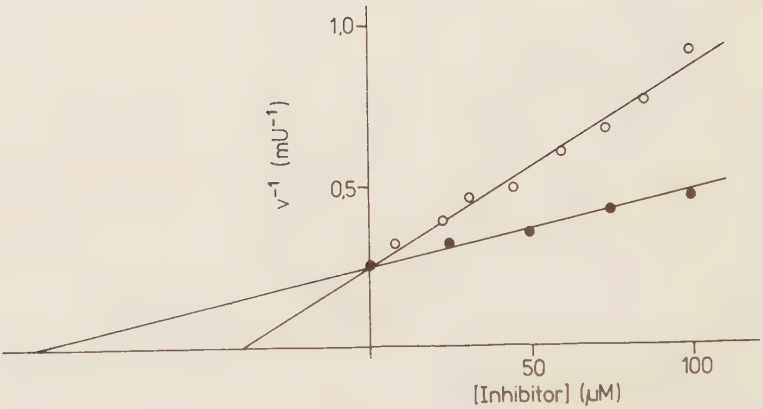

Fig. 18

Dixon-Diagramm der GSSG-Reduktion in Anwesenheit von Sulfobromophthalein S-glutathion (○) und Sulfobromophthalein (●).

3.4 Der Einfluß von Glutathion und Glutathion S-Konjugaten auf die Ausscheidung von Taurocholat in die Galle

Eine große Anzahl hepatotoxischer Substanzen und Medikamente beeinflussen die kanalikuläre Ausscheidungskapazität der Leber. Ihre Wirkung reicht von der Inhibierung bestimmter Ausscheidungssysteme bis hin zur intrahepatischen Cholestase mit Dilatation der Gallengänge und Hyperbilirubinämie (43, 84). Außer der Bedeutung der S-Konjugation für die Ausscheidung elektrophiler Moleküle im Sinne einer Erhöhung der maximalen Transportkapazität nach S-Konjugation (42), ist über den Einfluß von Glutathion auf die Zusammensetzung der Galle wenig bekannt.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß unter oxidativen Bedingungen der intrazelluläre GSSG-Gehalt der Leber erhöht ist und mit der gesteigerten GSSG-Ausscheidung in die Galle korreliert (3.1). Inhibierung des GSSG-Transports durch S-Konjugate bei gleichzeitiger Inhibierung der Glutathion-Reduktase führen zur weiteren Erhöhung des intrazellulären Glutathiondisulfids (3.2, 3.3). Umgekehrt wird der S-Konjugat-Efflux in die Galle durch Stimulation des GSSG-Transports reduziert (3.2).

Im folgenden soll die Beeinflussung anderer Transportsysteme der Leber durch intrazelluläres Glutathiondisulfid und S-Konjugation elektrophiler Moleküle am Beispiel der Taurocholat-Aufnahme und -Ausscheidung in die Galle untersucht werden. Die intrazelluläre GSSG-Bildung wurde durch das Thiol-Oxidans Diamid (85, 86), weiterhin durch Hydroperoxide und Menadion stimuliert. Die intrazelluläre S-Konjugat-Bildung wurde durch Substrate der S-Transferasen, CDNB, Diethylmaleat und Phoron induziert. Einige Aspekte des hepatischen Taurocholat-Transports sind in 1.4 dargestellt.

3.4.1 Taurocholat-Aufnahme und Ausscheidung in die Galle während der Infusion von Diamid und Menadion

Perfusion der Leber mit physiologischen Taurocholat-Konzentrationen führt zu steady-state-Bedingungen der sinusoidalen Aufnahme und biliären Ausscheidung, d.h. Taurocholat-Aufnahme und -Ausscheidung sind quantitativ gleich (48). Fig. 19a zeigt die Taurocholat-Aufnahme der Leber und konstante -Ausscheidung in die Galle während 60 minütiger Infusion. 98% des angebotenen Taurocholat (5 µM, einer Infusionsrate von 21 nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$ entsprechend) wurden von der Leber aufgenommen.

Beeinflussung des Thiol-Status der Leber durch Diamid (100 µM), infundiert über 5 Minuten, reduziert den Taurocholat-Efflux in die Galle um 60%, während die sinusoidale Aufnahme konstant bleibt (Fig. 19b). Nicht ausgeschiedenes Taurocholat entsprach dem Betrag, um den der intrazelluläre Taurocholat-Gehalt erhöht war. Weiterhin oxidiert Diamid intrazelluläres Glutathion. Der GSSG-Gehalt der Leber stieg von 18 auf 120 nmol x g $Leber^{-1}$, der biliäre GSSG-Efflux auf 13 nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$ (Fig. 19b). Somit besteht möglicherweise eine Beziehung zwischen der Inhibierung der Taurocholat-Ausscheidung und dem Oxidationszustand des intrazellulären Glutathions oder anderer Sulfhydrylgruppen.

Menadion erhöht durch Redox-Zyklus (75) und Hemmung des GSSG-Transports den intrazellulären Glutathiondisulfid-Gehalt (3.2). Infusion von Menadion (50 µM) reduziert den biliären Taurocholat-Efflux um etwa 90%, die Aufnahme wird dagegen nicht beeinflußt (Fig. 20). Der GSSG-Efflux in die Galle steigt während der Inhibierungsperiode auf 25 nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$. Diesem Efflux würde nach Extrapolation der Geraden in Fig. 12 ein intrazellulärer GSSG-Gehalt von etwa 600 nmol x g $Leber^{-1}$ entsprechen. Jedoch besteht hier die Möglichkeit, daß die Inhibierung nicht nur durch erhöhtes intrazelluläres GSSG verursacht wird, sondern auch durch Menadionmetabolite, die

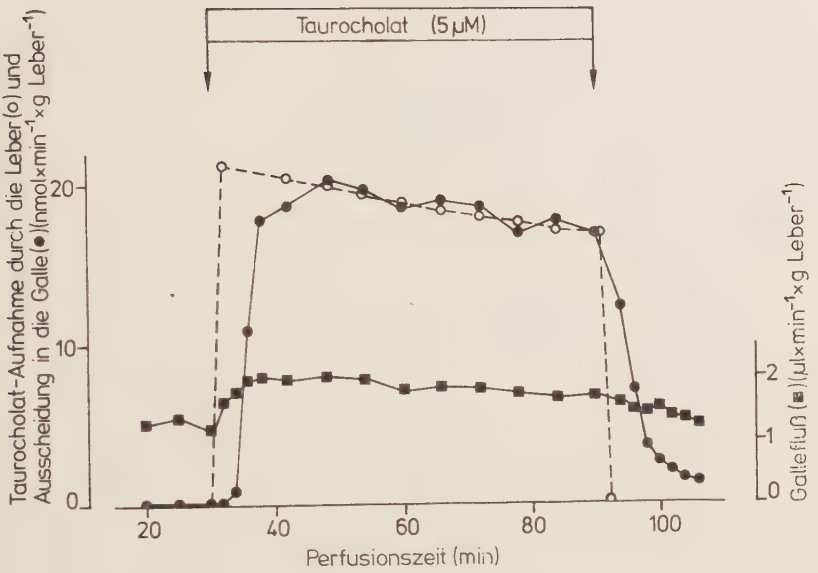

Fig. 19a

Gallefluß (■), Taurocholat-Aufnahme (O) und -Ausscheidung in die Galle (●) während der Infusion von Taurocholat (5 µM).

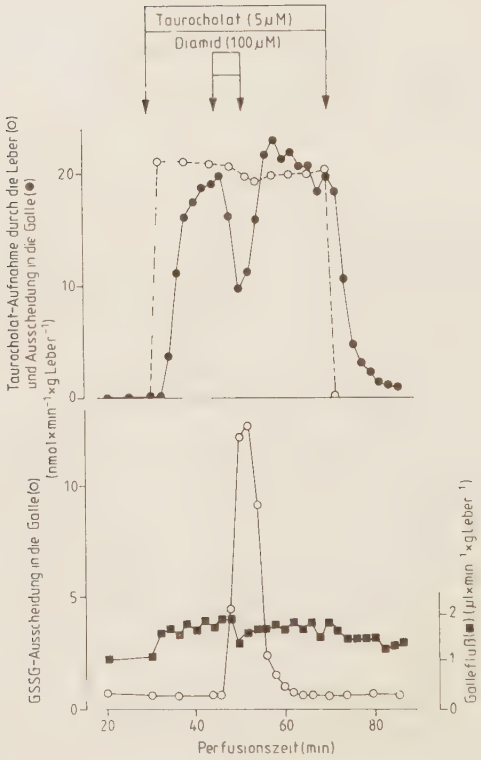

Fig. 19b

Beeinflussung der Taurocholat-Ausscheidung in die Galle durch Infusion von Diamid.

Taurocholat (5 µM) wurde von der 30. - 70. Minute, Diamid (100 µM) von der 45. - 51. Minute infundiert. Taurocholat-Aufnahme (○) und -Ausscheidung in die Galle (●) sind im oberen Abschnitt der Figur dargestellt, GSSG-Efflux in die Galle (○) und Gallefluß (■) im unteren Abschnitt.

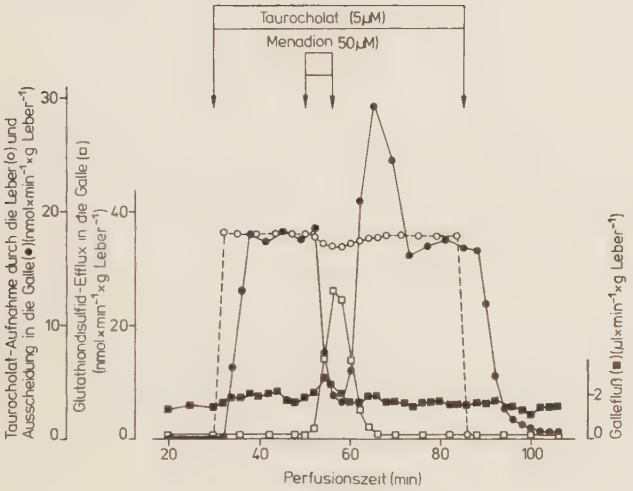

Fig. 20

Beeinflussung der biliären Taurocholat-Ausscheidung durch Menadion.

Taurocholat (5 µM) wurde von der 30. - 85. Minute infundiert, Menadion (50 µM) von der 50. - 56. Minute. Die Symbole sind: Taurocholat-Aufnahme durch die Leber, ○; biliäre Taurocholat-Ausscheidung, ●; biliärer GSSG-Efflux, □; Gallefluß, ■.

ebenfalls in die Galle ausgeschieden werden (77). Zur genaueren Untersuchung der Diamid- und Menadion-Inhibierungen wurde die Beeinflussung der Taurocholat-Ausscheidung durch Hydroperoxide untersucht, deren Metabolismus weniger komplex ist und durch die Reaktion der Glutathion-Peroxidase zur Erhöhung des intrazellulären GSSG führt.

3.4.2 Beeinflussung der Taurocholat-Ausscheidung durch H_2O_2 und und t-Butylhydroperoxid

Der Taurocholat-Efflux in die Galle wird in Anwesenheit von t-Butylhydroperoxid (Tab. 4) oder H_2O_2 (Fig. 21), 250 µM, völlig gehemmt. Die Inhibierung ist reversibel und geht mit einer Steigerung der biliären GSSG-Ausscheidung von 0.4 auf 16 nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$ einher (Tab. 4). Aus dem Efflux des oxidierten Glutathions und der Beziehung in Fig. 11a kann man schließen, daß der intrazelluläre GSSG-Gehalt auf über 200 nmol x g $Leber^{-1}$ ansteigt. Der Gallefluß wird reduziert und entspricht den Kontrollwerten vor der Taurocholat-Zugabe. Nach Beendigung der Hydroperoxid-Infusion kehrt die Taurocholat-Ausscheidung überschießend auf Werte zurück, die vor der Inhibierung bestanden (Fig. 21 und 22). Die Taurocholat-Aufnahme ist nicht beeinflußt (Tab. 4). Somit ist die Inhibierung nicht durch Beeinflussung der sinusoidalen Transportprozesse bedingt.

3.4.3 Intrazelluläre Taurocholat-Akkumulation während der Infusion von t-Butylhydroperoxid

Intrazelluläres (^3H)-Taurocholat wurde in Leberhomogenaten zu verschiedenen Zeitpunkten der Perfusion bestimmt (Tab. 4). Während der Infusion mit Taurocholat ohne Hydroperoxid betrug der intrazellulä-

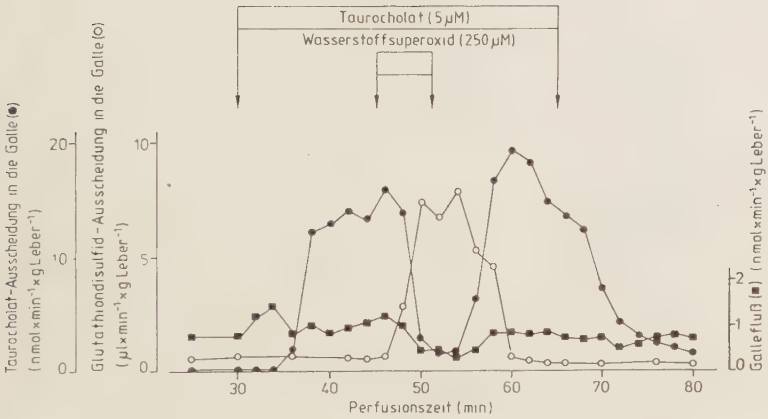

Fig. 21

Taurocholat-Efflux in die Galle (●) und Gallefluß (■) während der Stimulation der biliären GSSG-Ausscheidung (○) durch H_2O_2. Taurocholat wurde von der 30. - 65. Minute, H_2O_2 von der 45. - 51. Minute infundiert. Die Infusionsraten für Taurocholat betrugen 18, für H_2O_2 1000 nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$.

Tabelle 4

Inhibierung der Taurocholat-Ausscheidung in die Galle während der Verstoffwechselung von t-Butylhydroperoxid

Die Lebern wurden wie in Fig. 21 dargestellt, perfundiert. Von der 45. - 51. Minute wurde t-BOOH (250 µM) infundiert. Während jeder Perfusion wurden 2 Frierstops durchgeführt, entweder zur 42. und 51. Minute, oder zur 42. und 65. Minute. Nach dem 1. Frierstop wurde der verbliebene Rest des Leberlappens abgebunden, nach dem 2. Frierstop die Perfusion beendet. Da die Infusionsrate der Infusionspumpe während der Versuche konstant blieb, das Lebergewicht aber durch den Frierstop abnahm, erhöhte sich die Infusionsrate/g Leber. Sie betrug 39, 45 und 46 nmol/min x g Leber zur 42., 51. und 65. Minute. Die angegebenen Daten sind $\bar{x} \pm$ S.E.M. von 4 - 6 Perfusionen.

		Taurocholat				
Zeit des Frierstops (min)	Bedingung	Aufnahme der Leber (nmol x min^{-1})	Efflux in die Galle x g $Leber^{-1}$)	Intrazellulärer Gehalt (nmol x g $Leber^{-1}$)	GSSG-Efflux in die Galle (nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$)	Gallefluß [a] (µl x min^{-1} x g $Leber^{-1}$)
42	Kontrolle	38 ± 2	34 ± 5	36 ± 19	0.4 ± 0.1	1.7 ± 0.2
51	t-BOOH (250 µM) von der 45.-51. Minute	43 ± 3	5 ± 0.4	270 ± 19	16.0 ± 2.0	1.2 ± 0.2
	Kontrolle	43 ± 4	39 ± 4	26 ± 19	0.5 ± 0.1	2.0 ± 0.3
65	Nach t-BOOH Infusion	41 ± 6	43 ± 5	71 ± 29	0.4 ± 0.1	1.6 ± 0.2
	Kontrolle	47 ± 3	40 ± 6	66 ± 41	0.4 ± 0.1	2.0 ± 0.1

[a] Vor der Taurocholat-Zugabe betrug der Gallefluß 1.3 ± 0.1 µl x min^{-1} x g $Leber^{-1}$.

re Taurocholat-Gehalt 36 nmol x g Leber^{-1} (42. Minute). Dieser Wert stieg innerhalb der 6 minütigen t-Butylhydroperoxid-Infusion (1 µmol x min^{-1} x g Leber^{-1}) auf 270 nmol x g Leber^{-1} (51. Minute). Dagegen wurde die Taurocholat-Ausscheidung in die Galle von 34 auf 5 nmol x min^{-1} x g Leber^{-1} reduziert.

Somit sind bei unbeeinflußter Aufnahme innerhalb der Inhibierungsperiode etwa 180 nmol Taurocholat/g Leber weniger transportiert worden, die der intrazellulären Akkumulation entsprechen. Die intrazelluläre Akkumulation erklärt weiterhin die überschießende Ausscheidung nach Beendigung der Menadion, H_2O_2 und t-BOOH-Infusion in den Fig. 20, 21 und 22. Die anfangs gesteigerte Taurocholat-Ausscheidung trägt entscheidend zur Senkung des erhöhten intrazellulären Taurocholat-Gehalts bei, der 14 Minuten nach Beendigung der t-BOOH-Infusion 71 nmol x g Leber^{-1} beträgt (Tab. 4, 65. Minute). Somit ist die intrahepatische Taurocholat-Akkumulation reversibel.

3.4.4 Taurocholat-Efflux in die Galle von Selenmangel-Lebern

Die Beeinflussung der Taurocholat-Ausscheidung in Lebern von Ratten, die über 4 Wochen selenfreies Futter erhielten, wird in Fig. 22 gezeigt. Die Inhibierung des Taurocholat-Effluxes ist abhängig von der intrazellulären Glutathion-Peroxidase-Aktivität. Mit H_2O_2 als Substrat der selenabhängigen Glutathion-Peroxidase besteht keine signifikante Inhibierung, während mit t-BOOH als Substrat beider Peroxidasen Inhibierung besteht, jedoch geringer als in normalen Lebern. Die fehlende Hemmung mit H_2O_2 zeigt, daß die Beeinflussung der Taurocholat-Ausscheidung nicht durch die Toxizität der Hydroperoxide bedingt ist, sondern erst dann besteht, wenn ihr Metabolismus durch die Glutathion-Peroxidase zu Änderungen im Glutathion-Status der Leber führen.

Allgemeine Schädigung der Leber als Ursache der Inhibierung kann

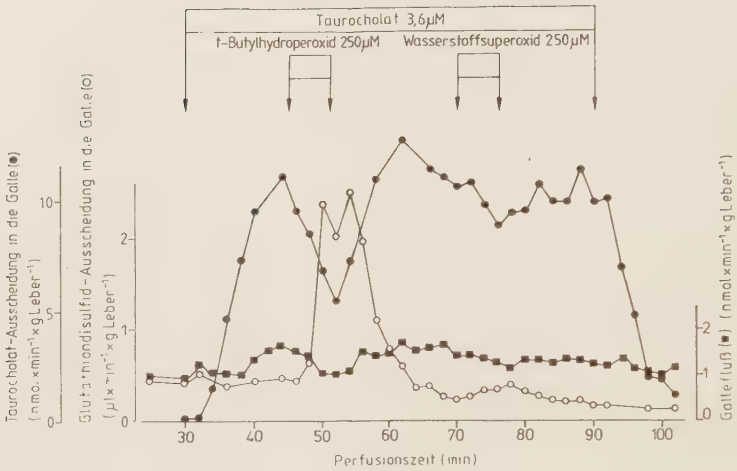

Fig. 22

Taurocholat-Ausscheidung in die Galle von Selenmangel-Ratten während der Infusion von H_2O_2 und t-Butylhydroperoxid.

Die Infusionsrate des Taurocholats von der 30. - 95. Minute betrug 11 nmol/ min x g Leber. t-BOOH (250 µM) wurde von der 45. - 51. Minute, H_2O_2 (250 µM) von der 70. - 76. Minute infundiert. Die Aktivität der selenabhängigen Glutathion-Peroxidase betrug weniger als 5% der Kontrollaktivität. Die Symbole sind: Taurocholat-Efflux in die Galle, ●; GSSG-Efflux in die Galle, ○; Gallefluß, ■.

ebenfalls ausgeschlossen werden. Die LDH-Aktivität im Perfusat steigt von 1.0 ± 0.2 unter Kontrollbedingungen auf nur 9.8 ± 3.2 mU x min^{-1} x g $Leber^{-1}$ (n=4) nach 6 minütiger Hydroperoxid-Zugabe.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangt man, wenn Menadion (50 µM) selenarmen Lebern infundiert wird. Die Taurocholat-Ausscheidung ist nur gering gehemmt, die GSSG-Ausscheidung kaum erhöht (Fig. 23). Dies bedeutet, daß Menadion ebenfalls durch Bildung von H_2O_2, das von der selenabhängigen Glutathion-Peroxidase metabolisiert wird, den Glutathion-Redox-Status ändert und nicht durch seine Metabolite oder deren biliäre Ausscheidung die fast vollständige Inhibierung des Taurocholat-Effluxes in normalen Lebern verursacht.

3.4.5 Beziehung zwischen der Inhibierung der biliären Taurocholat-Ausscheidung und dem intrazellulären GSSG-Gehalt

Die Inhibierung der Taurocholat-Ausscheidung in die Galle korreliert mit dem intrazellulären Glutathiondisulfid-Gehalt (Fig. 24). Diese Beziehung besteht sowohl mit Diamid (geschlossene Kreise), als auch mit t-Butylhydroperoxid (offene Kreise), wodurch gezeigt wird, daß GSSG unter beiden Bedingungen an der Inhibierung beteiligt ist. Der intrazelluläre GSH-Gehalt wird weniger beeinflußt: 5.4 ± 0.8 unter Kontrollbedingungen, 5.1 ± 0.7 mit Diamid und 4.0 ± 0.7 µmol x g $Leber^{-1}$ mit t-BOOH in den Experimenten der Fig. 24 (n=3-5). Die geringen GSH-Abfälle sind durch gesteigerte GSSG-Bildung und -Ausscheidung erklärbar.

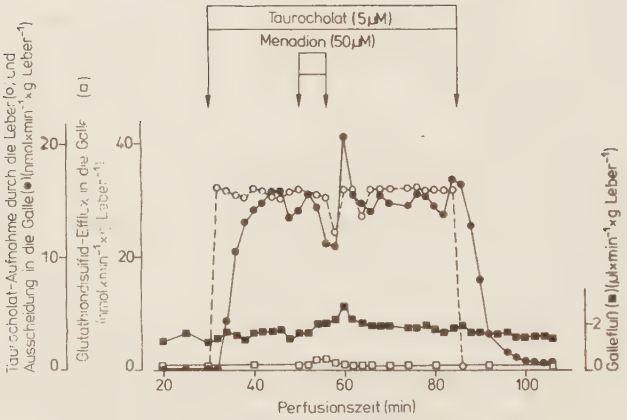

Fig. 23

Biliäre Taurocholat-Ausscheidung von Selenmangel-Ratten während der Infusion von Menadion.

Taurocholat (5 µM) wurde von der 30. - 85. Minute infundiert, Menadion (50 µM) von der 50. - 56. Minute. Die Symbole sind : Taurocholat-Aufnahme (○) und biliäre -Ausscheidung (●), GSSG-Efflux in die Galle (□) und Galleфluß (■).

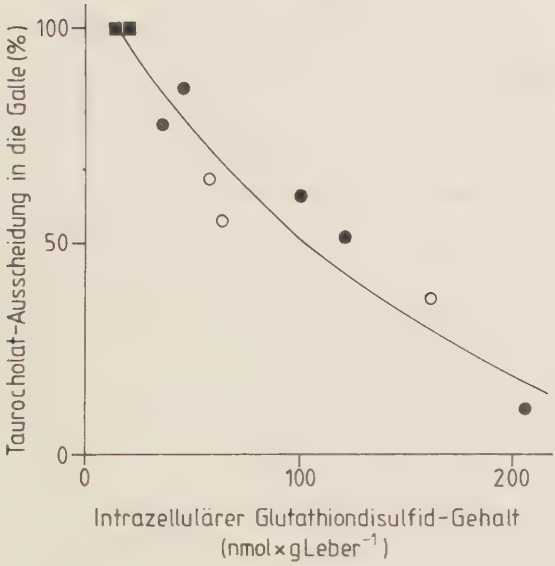

Fig. 24

Beziehung zwischen dem intrazellulären GSSG-Gehalt und der Inhibierung der biliären Taurocholat-Ausscheidung.

Die Lebern wurden ab der 30. Minute mit Taurocholat (5 µM) perfundiert. Von der 45. - 51. Minute wurde zusätzlich mit Diamid (100 und 250 µM), (●), oder t-Butylhydroperoxid (80 und 180 µM), (○), perfundiert. Der intrazelluläre GSSG-Gehalt, durch Frierstop und Aufarbeitung der Leber ermittelt, wurde mit der Inhibierung der biliären Taurocholat-Ausscheidung zur 51. Minute (TC-Ausscheidung zur 45. Minute = 100%), (■), korreliert.

3.4.6 Einfluß der Glutathion S-Konjugation elektrophiler Agentien auf die biliäre Taurocholat-Ausscheidung

Der Einfluß der S-Konjugation alkylierender Substanzen auf die Ausscheidung des Taurocholats in die Galle, wird in Fig. 25 und Tab. 5 dargestellt. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol (30 µM) führt zur schnellen Inhibierung der Taurocholat-Ausscheidung (27%), die reversibel ist. Während der Inhibierung besteht maximale Steigerung der S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion-Ausscheidung in die Galle (120 nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$), ebenso ist der Gallefluß stark erhöht (3.5 µl x min^{-1} x g $Leber^{-1}$). Mit CDNB (60 µM) wird die Inhibierung auf 39% gesteigert, während die biliäre Ausscheidung des Konjugats und der Gallefluß nicht zunehmen, in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen (41). Intrazelluläres GSSG ist durch CDNB (60 µM) nur gering erhöht (24 ± 0.5 nmol x g $Leber^{-1}$), während GSH auf 4.1 ± 0.4 µmol x g $Leber^{-1}$ abfällt. Während der 6 minütigen Zugabe von CDNB (60 µM) wurden der Leber 1.4 µmol CDNB x g $Leber^{-1}$ angeboten, die den Abfall des GSH durch S-Konjugation erklären.

Phoron (60 µM) und Diethylmaleat (60 µM), ebenfalls Substrate der Glutathion S-Transferasen, hemmen wie CDNB den Taurocholat-Efflux reversibel, jedoch hemmt Diethylmaleat effektiver (32%) als Phoron (10%) (Tab. 5). Der Gallefluß ist als Zeichen hoher S-Konjugat-Ausscheidung stark erhöht (Tab. 5). In allen Fällen wurde die Taurocholat-Aufnahme nicht signifikant beeinflußt.

Fig. 25 zeigt weiterhin den Einfluß von CDNB auf die Taurocholat-Ausscheidung von Lebern, die zur Glutathionverarmung mit Phoron vorbehandelt wurden (2.2, 51), im Vergleich zu unbehandelten Lebern. Die Taurocholat-Aufnahme ist unter beiden Bedingungen unverändert (Fig. 25, Mitte), während die durch CDNB induzierte Reduktion der Taurocholat-Ausscheidung (Fig. 25, Oben) vorbehandelter Lebern (offene Symbole) verzögert eintritt, jedoch erheblich länger anhält.

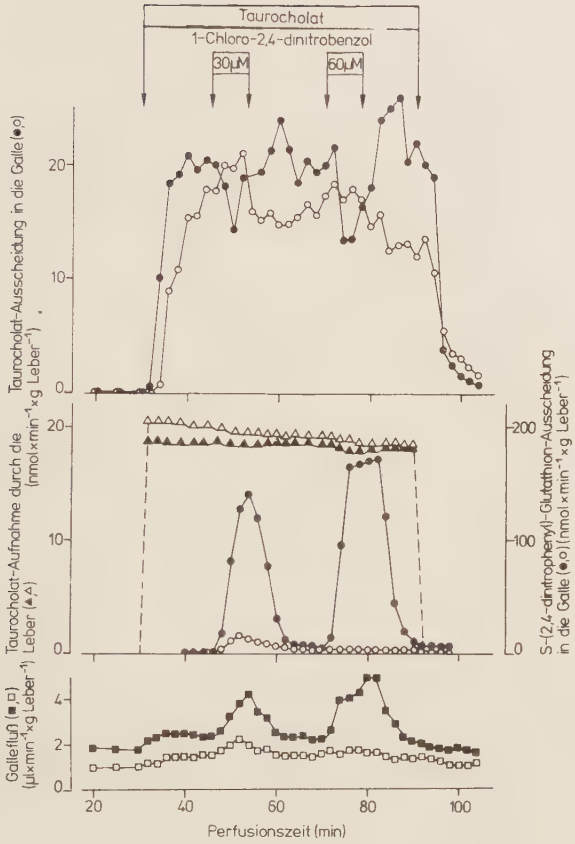

Fig. 25

Beeinflussung der biliären Taurocholat-Ausscheidung (○ , ●) (Oben), der Taurocholat-Aufnahme (△ , ▲) (Mitte) und des Galleflusses (□ , ■) durch CDNB (30 und 60 µM) in glutathionverarmten (offene Symbole) und normalen Lebern (geschlossene Symbole).

Ferner ist der S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion-Efflux in die Galle dargestellt (○ , ●) (Mitte).

Tabelle 5

Beeinflussung der Taurocholat-Aufnahme und -Ausscheidung in die Galle während der S-Konjugation elektrophiler Agentien.

Rattenlebern wurden mit Taurocholat (5 µM) perfundiert. Von der 45. - 51. Minute wurden alkylierende Agentien infundiert. Die Inhibierung in Prozent ist die Reduktion der Taurocholat-Aufnahme bzw. -Ausscheidung zur 51. Minute, bezogen auf entsprechende Werte zur 45. Minute (= 100%). Die Werte sind $\bar{x} \pm$ S.E.M. (n=4-5).

Zugaben	Inhibierung der Taurocholat -Aufnahme der Leber	Inhibierung der Taurocholat -Ausscheidung in die Galle	Gallefluß
	(%)	(%)	µl x min^{-1} x g $Leber^{-1}$
keine	---	---	1.8 ± 0.1
CDNB, 30 µM	2 ± 1	27 ± 4	3.5 ± 0.3
CDNB, 60 µM	3 ± 1	39 ± 4	3.9 ± 0.4
Diethylmaleat, 60 µM	3 ± 1	32 ± 2	3.6 ± 0.1
Phoron, 60 µM	0	10 ± 3	3.3 ± 0.6

Dieser Versuch zeigt, daß die Taurocholat-Aufnahme der Leber durch Fehlen des intrazellulären Glutathions nicht beeinflußt wird und die verminderte biliäre Taurocholat-Ausscheidung nicht an die Anwesenheit von S-Konjugaten gebunden ist, sondern auch bei Anwesenheit der elektrophilen Vorstufen besteht. Die verlängerte Hemmung der Taurocholat-Ausscheidung in glutathionverarmten Lebern unterstreicht die protektive Funktion des Glutathions.

4. Diskussion

4.1 Erhöhung des intrazellulären GSSG-Gehalt unter oxidativen Bedingungen

Der intrazelluläre GSSG-Gehalt der unter Kontrollbedingungen in situ perfundierten Rattenleber beträgt 18 nmol x g Leber^{-1} (Tab. 1) und entspricht einer Konzentration von 32 µM, unter der Annahme einer homogenen Verteilung im Wasserraum der Zelle von 0.55 ml x g Leber^{-1} (68). Heterogene Verteilung des GSSG ist aber denkbar und wurde nicht näher untersucht. Nach Veech et al. (87) sollte die Reaktion der GSSG-Reduktase zu Glutathiondisulfid-Konzentrationen führen, die 1 - 10 nM betragen. Da im Überschuß zum Leberpulver zugefügtes GSH nicht zur Erhöhung der GSSG-Gehalte führte, können durch GSH-Autoxidation artifiziell erhöhte GSSG-Gehalte ausgeschlossen werden (Tab. 1). Somit scheint die intrazelluläre Reduktion des Glutathiondisulfids kinetisch limitiert zu werden.

Die Beobachtung, daß intrazelluläre GSSG-Gehalte unter verschiedenen metabolischen Bedingungen ansteigen (Tab. 1, Fig. 6), erlaubt die Schlußfolgerung, daß intrazelluläre GSSG-Fluktuationen bestehen, obwohl die Glutathion-Reduktase-Aktivität von 10 U x g Leber^{-1} sehr hoch ist (83). Damit geht der früher beobachtete stimulierte GSSG-Efflux mit Steigerungen des intrazellulären GSSG-Gehalts einher.

Intrazelluläre GSH-Gehalte sind unter den verschiedenen oxidativen Bedingungen kaum beeinflußt. Dies ist besonders für die Versuche mit Nitrofurantoin von Bedeutung, das im Gegensatz zu anderen Nitrofuranen nicht mit GSH in Anwesenheit von Leberextrakten konjugiert wird (88). Somit stimmen in vitro Ergebnisse mit Extrakten und Perfusionsergebnisse überein.

4.2 Die Glutathion-Ausscheidung unter verschiedenen metabolischen Bedingungen

Die GSSG-Konzentrationen der Galle unter Kontrollbedingungen sind mit früheren Ergebnissen vergleichbar (26, 67, 69), (Tab. 2), während die GSH-Konzentrationen erheblich variieren (Tab. 2). Anästhesierte Ratten mit intaktem Kreislauf zeigten einen hohen GSH-Efflux (Tab. 2), (67, 69), in situ perfundierte Lebern dagegen schieden erheblich weniger GSH in die Galle aus. An isoliert perfundierten Lebern wurde kein GSH-Efflux (Tab. 2), (26), beobachtet.
Die Unterschiede zwischen in situ und isoliert perfundierten Lebern sind schwer zu interpretieren. Möglicherweise handelt es sich nicht um Diskrepanzen, die durch die verschiedenen Versuchsbedingungen zu erklären sind, sondern lediglich um statistische Häufungen tages- oder jahreszeitlicher Schwankungen, da in späteren Versuchen auch in der Galle der isoliert perfundierten Leber wechselnd hohe GSH-Konzentrationen gefunden wurden.

Unterschiedliche Methoden des Gallesammelns in Eppendorf-Cups bei $0^{\circ}C$ und sofortiger Bestimmung der GSSG-Konzentration oder Sammeln in m-Phosphorsäure, führten zu gleichen GSSG-Konzentrationen der Galle (Tab. 2). Lediglich in Proben geringer GSSG-Konzentrationen und später Bestimmung (Fig. 2a) kann m-Phosphorsäure vor geringer GSH-Autoxidation schützen.
Ein Gallevolumen von 2.3 µl x g Leber^{-1} (53) bedeutet, daß die Galle bei einem Gallefluß von 1.0 - 1.5 µl x min^{-1} x g Leber^{-1} etwa 2 Minuten benötigt, um die Leber zu passieren, bis sie gesammelt wird. Während dieser Passagezeit besteht aber die Möglichkeit zur GSH-Autoxidation, so daß in der Galle bestimmtes GSSG durch Autoxidation von GSH entstanden ist. Die verschiedenen Bedingungen der Tab. 2 zeigen konstante GSSG-Konzentrationen der Galle, während die GSH-Konzentrationen sehr differieren. GSH-Autoxidation als alleini-

ge Ursache der konstanten GSSG-Konzentration erscheint deshalb unwahrscheinlich. Versuche mit artifiziell erhöhtem Galle-Totraum (langer Polyethylen-Tubus zum Ableiten der Galle) ergaben keine erhöhten GSSG-Konzentrationen (67). GSH-Autoxidation sollte ferner durch Verkürzung der Gallepassage vermindert werden. Die GSH- und GSSG-Ausscheidung in die Galle unter Kontrollbedingungen wird jedoch nicht beeinflußt, wenn der Gallefluß durch Infusion von Taurocholat oder Sulfobromophthalein S-glutathion stimuliert wird und hierdurch die Passagezeit um die Hälfte reduziert wird (89). Außerdem kommt es unter oxidativen Bedingungen zur starken Stimulation des GSSG-Effluxes, während der GSH-Efflux bei kaum geändertem Gallefluß (Fig. 4) konstant bleibt (70) oder leicht abnimmt (90). Aus diesen Ergebnissen und der Beziehung in Fig. 6 kann geschlossen werden, daß stimulierter GSSG-Efflux in den Gallekanalikulus die Leistung eines eigenständigen GSSG-Transportsystems darstellt und nicht auf GSH-Autoxidation beruht.

Die Bedeutung der GSSG-Ausscheidung in die Galle als Parameter der Metabolisierung von H_2O_2 durch die Glutathion-Peroxidase zeigt die Fig. 5 . Der überproportional hohe Anstieg der GSSG-Ausscheidung bei erhöhter Freisetzung von NH_3-Äquivalenten als Maß des Umsatzes von Monoaminen durch die Monoamino-Oxidase und somit der intrazellulären H_2O_2 - Produktion läßt an GSSG-Bildung denken, die nicht durch Freisetzung von NH_3-Äquivalenten als Maß der Oxidation von Monoaminen erklärbar ist. Denkbar wäre der weitere Umsatz der durch die Reaktion der Monoamino-Oxidase entstehenden Aldehyde durch Aldehyd-Oxidasen, die zur weiteren H_2O_2 - Bildung führen oder eine verminderte GSSG-Reduktion durch Hemmung der Glutathion-Reduktase. Jedoch sind weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Beziehung erforderlich. Durch Fig. 5 wird deutlich, daß es besonders wichtig ist, Kenntnisse über mögliche Beeinflussungen der biliären GSSG-Ausscheidung zu besitzen, da nur in diesem Fall die Validität derartiger Beziehungen gesichert ist.

4.3 Das kanalikuläre GSSG- und S-Konjugat-Transportsystem der Leber

Die GSSG-Ausscheidung in die Galle ist abhängig vom intrazellulären GSSG-Gehalt der Leber (Fig. 6). Aus der Steigung der Geraden in Fig. 6a errechnet sich ein zusätzlicher GSSG-Efflux von 15 nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$, wenn die intrazelluläre GSSG-Konzentration um 100 µM ansteigt. Ob der hohe GSSG-Konzentrationsgradient zwischen Galle und intrazellulärem Wasserraum (47 $\pm$ 3) durch sekundäre Resorptionsprozesse des Gallengangepithels beeinflußt werden kann, ist nicht bekannt. Da die A. hepatica, die die Gallengänge versorgt, nicht perfundiert wird, stellt der Galleraum einen inaktiven Totraum dar (49), so daß derartige Prozesse unwahrscheinlich sind.
Die unterschiedlichen Steigungen der Geraden in Fig. 6a und 6b lassen sich durch den unterschiedlich hohen GSSG-Efflux ins Perfusat während der Infusion von t-BOOH erklären. Die Summe von biliärem und sinusoidalem GSSG-Efflux, aufgetragen gegen die intrazelluläre GSSG-Konzentration, ergibt wiederum die Beziehung in Fig. 6a. Somit ist der durch t-BOOH induzierte GSSG-Efflux auf die Galle und den sinusoidalen Raum verteilt. In Anwesenheit von t-BOOH (50 µM) betrug die GSSG-Ausscheidung ins Perfusat 4.3 $\pm$ 1 nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$ (n=6). Dies entspricht einer Perfusatkonzentration von 1 µM, während die intrazelluläre GSSG-Konzentration 100 µM beträgt. Der Konzentrationsgradient zwischen Perfusat und Leber ist somit sehr gering und der beobachtete sinusoidale GSSG-Efflux durch Diffusion erklärbar. GSSG im effluenten Perfusat wurde unter Kontrollbedingungen nicht beobachtet (Fig. 3), obwohl die intrazelluläre Konzentration 32 µM beträgt. Änderungen der intrazellulären GSSG-Verteilung unter oxidativen Bedingungen könnte diese Diskrepanz erklären. Ursache könnte aber auch die Schädigung der sinusoidalen Membran durch t-BOOH oder Peroxy-Radikale (72) sein, die die GSSG-Diffusion ins effluente Perfusat erst ermöglicht. Da der Gallefluß während der Infusion von t-BOOH leicht abnimmt, könnte sinusoidales GSSG auch die Folge einer

intrahepatischen Cholestase sein. Weitere Untersuchungen müssen jedoch erfolgen, um die Ursache der sinusoidalen GSSG-Ausscheidung zu klären.

Ein Transportmaximum der GSSG-Ausscheidung in die Galle, als Kriterium des trägervermittelten Transports, wurde nicht beobachtet (Fig. 6) und ist deshalb nur schwer zu bestimmen, da zur maximalen Stimulation der biliären GSSG-Ausscheidung oxidative Bedingungen erforderlich sind, die zur Zellschädigung führen, somit die Ausscheidungskapazität der Leber beeinflussen und keine exakten Schlußfolgerungen über mögliche Transportmaxima zulassen. Dies wird durch Fig. 7 gezeigt, in der die kombinierte Infusion von Benzylamin und Nitrofurantoin den GSSG-Efflux auf ca. 100 nmol x min^{-1} x g $Leber^{-1}$ steigert, der innerhalb von 5 Minuten um 60% abfällt, während der intrazelluläre Gehalt konstant bleibt.

Ein wichtiges und auf die Existenz eines Transportsystems hinweisendes Kriterium ist die Hemmbarkeit der biliären GSSG-Ausscheidung. Stimulation der S-Konjugat-Ausscheidung in die Galle durch CDNB reduziert den durch t-BOOH oder Nitrofurantoin stimulierten GSSG-Efflux (Fig. 8 und 9), während der intrazelluläre GSSG-Gehalt konstant bleibt (mit Nitrofurantoin) oder ansteigt (mit t-BOOH und Benzylamin) (Tab. 3), (Fig. 11). Da die S-Transferase-Aktivität der Leber sehr hoch ist (41), sollte die intrazelluläre CDNB-Konzentration niedrig und die Inhibierung eine Folge der Anwesenheit von S-Konjugaten sein. Dies wird durch Infusion des gereinigten Sulfobromophthalein S-glutathions bestätigt, dessen Ausscheidung in die Galle ebenfalls zur Inhibierung des biliären GSSG-Effluxes führt (Fig. 10). Nach Infusion dieses S-Konjugates sind nur BSP-Metabolite in der Galle zu finden (80% S-Konjugat, 20% BSP-cysteinylglycin und BSP-cystein) (59), so daß Inhibierung durch die elektrophile S-Konjugat-Vorstufe BSP ausgeschlossen werden kann. Versuche mit isolierten Hepatozyten zeigen keine Inhibierung der GSSG-Ausscheidung durch CDNB (76), ver-

mutlich durch den Verlust der morphologischen Struktur von Galle- und sinusoidalen Raum bedingt. Offensichtlich ist das intakte Organ für derartige Studien besser geeignet.
Die Inhibierung der GSSG-Ausscheidung durch Menadion (Fig. 12) könnte ebenfalls durch S-Konjugate erfolgen. Da Menadion aber überwiegend als Glucuronid ausgeschieden wird (77), erscheint Hemmung durch letztere ebenfalls wahrscheinlich.

Umgekehrt konnte durch Stimulation der GSSG-Ausscheidung in die Galle durch Infusion von t-BOOH (Fig. 13) oder H_2O_2 (Fig. 14a) der S-Konjugat-Efflux gehemmt werden. Beeinflussung der CDNB-Aufnahme oder unspezifische Schädigung der kanalikulären Membran durch H_2O_2 konnte durch Versuche mit Lebern von Ratten ausgeschlossen werden, deren selenabhängige, H_2O_2 - metabolisierende Glutathion-Peroxidase-Aktivität weniger als 3% der Kontrollaktivität betrug. Durch die Infusion gleicher H_2O_2 - Konzentrationen konnte die S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion-Ausscheidung nicht beeinflußt werden (Fig. 14b).

Oshino und Chance (10) zeigten, daß H_2O_2 in normalen Lebern zu 50% von der Katalase umgesetzt wird. In Selenmangel-Lebern ist die Katalase-Aktivität verdoppelt (14) und sollte den Glutathion-Peroxidase Mangel derart kompensieren, daß in Kontroll- und Selenmangel-Lebern vergleichbare H_2O_2 - Konzentrationen vorliegen. Fehlende Inhibierung in Fig. 14b sollte deshalb nicht durch verstärkten H_2O_2 - Metabolismus der Katalase bedingt sein. Die Inhibierung ist somit von der intrazellulären GSSG-Bildung oder kanalikulären GSSG-Ausscheidung abhängig.
Hemmung der S-Konjugation durch GSSG und somit Beeinflussung der S-Konjugat-Ausscheidung ist unwahrscheinlich, da die S-Transferase-Aktivität in Leberhomogenaten nicht durch die in den Versuchen vorliegenden intrazellulären GSSG-Konzentrationen inhibiert wird, in

Übereinstimmung mit anderen Autoren (91), die für die Inhibierung der Diethylmaleat-S-Konjugation durch GSSG einen K_i von 2.3 mM angeben. Folglich sollte die Beeinflussung der S-Konjugat-Ausscheidung an der kanalikulären Membran erfolgen.
Neuere Untersuchungen zeigten weiterhin Kompetition bei der Ausscheidung verschiedener S-Konjugate in die Galle; Diethylmaleat reduzierte die biliäre Ausscheidung des infundierten Sulfobromophthalein S-glutathions (92).
Inwiefern es sich bei der Kompetition von GSSG und S-Konjugaten um die Beeinflussung der Bindung an Transportmoleküle der kanalikulären Membran oder der Beeinflussung der Bildung exozytotischer Vesikel handelt, kann durch diese Versuche nicht beantwortet werden. Ebenso bleibt ungeklärt, ob ein oder mehrere Transportsysteme an der Ausscheidung dieser Metabolite beteiligt sind.

Der hohe Galle/Zytosol - GSSG-Konzentrationsgradient (3.1), (33), die gegenseitige Beeinflussung der Ausscheidung von GSSG und S-Konjugaten (3.2), (93, 94) und die hier nicht dargestellte Hemmbarkeit des GSSG-Effluxes durch ATP-Verarmung der Leber (Infusion von Dinitrophenol, Cyanid und Fluorid) (95), erfüllen die Eigenschaften eines aktiven Transportsystems, das bereits an Erythrozyten (29) beschrieben wurde. In letzteren wurden zwei ATP-abhängige Transportsysteme mit einem niedrigen K_m von 100 µM und einem hohen K_m von 7.1 mM charakterisiert (29). Ein energieabhängiger Transport für S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion wurde ebenfalls in Erythrozyten gefunden (96), der in inside-out Vesikeln ATP-abhängig erfolgte (97). Weiterhin konnten Kondo et al. (97) zeigen, daß S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion den GSSG-Transport mit hoher Michaelis-Konstante kompetitiv inhibiert, während das Transportsystem mit niedriger Michaelis-Konstante unbeeinflußt blieb. An Vesikeln kanalikulärer Membranen konnte gleichfalls Kompetition zwischen GSSG und Benzylglutathion beobachtet werden (98, 99). Durch diese Versuche wird bestätigt,

daß die in den Perfusionen beobachtete GSSG- und S-Konjugat-Kompetition an membranständigen Transportsystemen erfolgt.

4.4 Die Bindung von Glutathion S-Konjugaten und ihren elektrophilen Vorstufen an der Glutathion-Reduktase

Die Ergebnisse in Tab. 3 zeigen exzessive GSSG-Akkumulation während der Kompetition des durch Benzylamin oder t-BOOH stimulierten GSSG-Effluxes mit S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion. Fehlende Akkumulation mit Nitrofurantoin, einem Inhibitor der Glutathion-Reduktase (65), führte zu der Schlußfolgerung, daß die durch Hemmung der biliären GSSG-Ausscheidung nicht erklärbare intrazelluläre Akkumulation des Glutathiondisulfids eine Folge der Interaktion von S-Konjugaten und GSSG-Reduktase darstellt.
Versuche mit Leberextrakten und gereinigten S-Konjugaten von BSP und CDNB (Fig. 15) bestätigten diese Annahme und zeigten 50%-ige Inhibierung der GSSG-Reduktase bei 20-30 µM Inhibitorkonzentrationen.

Die enzymkinetischen Studien mit der gereinigten GSSG-Reduktase menschlicher Erythrozyten (Fig. 16 und 17) ergaben im Gegensatz zu intakten Erythrozyten (57), daß sowohl S-Konjugate als auch ihre elektrophilen Vorstufen die Glutathion-Reduktase inhibieren. Offensichtlich kann S-Konjugation elektrophiler Moleküle nicht vor reversibler Enzymhemmung schützen.
Für die Inhibierung der hepatischen GSSG-Reduktase sollten wegen der hohen intrazellulären S-Transferase-Aktivität die Thioether verantwortlich sein. Somit wird der intrazelluläre GSH/GSSG -Status der Leber unter oxidativen Bedingungen durch S-Konjugate auf doppelte Weise beeinflußt: Hemmung der GSSG-Ausscheidung und Hemmung der GSSG-Reduktion. Die effektive Ausscheidung in die Galle ist daher von großer Bedeutung, da sie zur Regulation der intrazellulären

Thioether-Konzentration beiträgt und somit die Enzymhemmung beeinflußt.

Die Fig. 16a und 16b zeigen die Inhibierung der GSSG-Reduktase menschlicher Erythrozyten durch CDNB und S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion. CDNB bindet am ES-Komplex unter Bildung eines dead-end-Komplexes (unkompetitive Hemmung), während das S-Konjugat nicht-kompetitiv bindet. Das Dixon-Diagramm in Fig. 16b zeigt für das S-Konjugat einen parabolischen Inhibierungstypen, dessen Interpretation nach Cleland (62) die Bildung von $E(I)^n$ -und $ES(I)^n$ -Komplexen voraussetzt. Die Beziehung mit BSP und seinem S-Konjugat ist dagegen linear (Fig. 18).

In Anwesenheit von Ammoniumsulfat (2 M), der Kontrollbedingung zu den kristallographischen Untersuchungen, besteht durch S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion kompetitive Hemmung (82), im Gegensatz zur nicht-kompetitiven parabolischen Inhibierung unter Standardbedingungen. Die Ursache dieser Diskrepanz ist offensichtlich die unterschiedliche Ionenstärke. Es bestehen Zweifel, ob in enzymkinetischen Studien verwendete niedrige Ionenstärken in vivo Bedingungen adäquater repräsentieren als Versuche mit hohen Ionenstärken (100). Die hohe chemische Aktivität von Wasser in verdünnten Proteinlösungen physiologischer Ionenstärke können zu Artefakten führen. Konzentrierte Lösungen und auch das intrazelluläre Milieu haben eine geringere Wasseraktivität (100).

Die bei hoher Ionenstärke gefundene kompetitive Inhibierung durch S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion stimmt mit den kristallographischen Ergebnissen überein. Das S-Konjugat bindet mit dem γ-Glutamylarm an der γ-Glutamylposition von Glutathion-I, während der Glycylarm neben dem γ-Glutamylarm von Glutathion-II bindet (82). Die Beeinflussung der GSSG-Bindung am aktiven Zentrum im Sinne einer kompetitiven Hemmung ist somit zu erwarten, obwohl keine Koinzidenz in der Bindung des Glutathion-Anteils von S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathion und

den beiden Glutathion-Anteilen von Glutathiondisulfid am aktiven Zentrum besteht. Somit ist der Nicht-Glutathion-Anteil (Dinitrophenyl-Gruppe) für die sterische Anordnung des Inhibitors am aktiven Zentrum von Bedeutung.

Gleiche Inhibitionstypen mit BSP und Sulfobromophthalein S-glutathion (Fig. 18) zeigen, daß hier offensichtlich die BSP-Komponente des S-Konjugats für die Bildung des EI-Komplexes verantwortlich ist. Beide Moleküle sind mehrfach negativ geladen und könnten somit an einem positiven Aminosäurerest des aktiven Zentrums binden, so daß die Bildung des ES-Komplexes zum Teil verhindert wird. Bindung am Imidazolium-Ion von His-467, das mit seiner Ionenbindung zu Glu-472 die GSSG-Bindungstasche des aktiven Zentrums bildet (81) und eine wichtige Funktion durch die Stabilisierung des Thiolat-Anions während der Katalyse besitzt (101, 102), könnte den Inhibitionstyp der Fig. 18 erklären.

BSP wird zur Prüfung der Leberfunktion des Menschen und verschiedener Versuchstiere häufig verwendet. Toxizität dieser Substanz wurde beschrieben. Reduktion des Galleflusses (103), Bindung an der mitochondrialen Membran und Hemmung des Phosphat-Transports (104) sowie Abfall des intrazellulären ATP (105) durch Hemmung des Pyruvat- und Succinat-Stoffwechsels (106) haben Zweifel an der Eignung dieser Substanz zur Bestimmung der Transportkapazität der Leber geweckt, die durch die Hemmung der GSSG-Reduktase verstärkt werden. Änderungen im Thiol-Status könnten ebenfalls die exkretorische Leistung der Leber beeinflussen.

4.5 Die Beeinflussung der Taurocholat-Ausscheidung durch Änderungen im Thiol-Status der Leber

Die biliäre Ausscheidung extern zugefügten Taurocholats wird durch die Anwesenheit des Thiol-Oxidans Diamid (Fig. 19b), ferner durch Quinone (Fig. 20) und Hydroperoxide (Fig. 21) gehemmt. Die sinusoidale Aufnahme wird nicht beeinflußt. Hemmung des biliären Exports durch t-BOOH führt zur intrazellulären Akkumulation von Taurocholat (Tab. 5) Die Inhibierung ist nicht die Folge einer Schädigung der kanalikulären Membran oder der dort lokalisierten Transportsysteme, sondern die Konsequenz metaboler Änderungen durch die Reaktion der Glutathion-Peroxidase, wie folgende Beobachtungen zeigen: Die LDH-Aktivität im effluenten Perfusat steigt nur wenig an, ebenso die LDH-Aktivität in der Galle (90). Der Gallefluß wird auf Werte reduziert, die Kontrollwerten vor der Taurocholat-Infusion entsprechen. Die Inhibierung der biliären Ausscheidung ist vollständig reversibel (Tab. 5, Fig. 19b, 20, 21), ebenso die intrazelluläre Akkumulation (Tab. 5). Die Inhibierung durch H_2O_2 und Menadion ist nur gering in Selenmangel-Lebern, deren H_2O_2 - metabolisierende Glutathion-Peroxidase-Aktivität fehlt (Fig. 22 und 23).

Die intrazellulären Taurocholat-Gehalte wurden unter der Annahme berechnet, daß sich der Galleraum von 2.3 µl x g Leber^{-1} nicht ändert. Würde die intrazelluläre Akkumulation durch Dilatation der Gallengänge vorgetäuscht, so müßte der Galleraum von 2.3 auf 25 µl x g Leber^{-1} ansteigen. Tatsächlich konnte aber nach der Methode in (53) ein Gallevolumen von 2-3 µl x g Leber^{-1} nachgewiesen werden, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von t-BOOH. Dilatation der Gallengänge kann damit ausgeschlossen werden.

Ob die Beeinflussung der Taurocholat-Ausscheidung während der stimulierten GSSG- und S-Konjugat-Ausscheidung durch Kompetition dieser Metabolite bedingt ist, kann nicht beantwortet werden. Jedenfalls

besitzt der intrazelluläre Thiol-Status eine wichtige Funktion, die durch die Beziehung zwischen intrazellulärem GSSG-Gehalt und der Inhibierung der Taurocholat-Ausscheidung dargestellt wird (Fig. 24). Fehlende Inhibierung in Selenmangel-Lebern (Fig. 22 und 23) erlaubt die Folgerung, daß die Inhibierung von der intrazellulären GSSG-Bildung abhängig ist. Die Korrelation des intrazellulären GSSG-Gehalts mit gemischten, hauptsächlich proteingebundenen Disulfiden (107), deren Bildung durch die Reaktion der Thiol-Transferasen katalysiert wird (108, 109), könnte insofern von Bedeutung sein, da GSSG mit membranständigen Thiolen reagieren kann (110) und somit möglicherweise Transportprozesse beeinflußt.

Die Inhibierung der Taurocholat-Ausscheidung ist nicht durch den geringen Abfall der intrazellulären GSH-Konzentration unter oxidativen Bedingungen zu erklären. Dies wird durch Versuche mit Phoron-vorbehandelten Ratten gezeigt, deren intrazelluläre GSH-Konzentration der Leber weniger als 10% der Kontrollkonzentration beträgt. In diesen Lebern ist die Taurocholat-Aufnahme und -Ausscheidung in die Galle kaum beeinflußt (Fig. 25). Die Infusion alkylierender Substanzen führt zur Hemmung der Taurocholat-Ausscheidung in normalen und Phoron-vorbehandelten Lebern (Fig. 25). In normalen Lebern besteht die Inhibierung kurzfristig und reversibel, in den vorbehandelten Lebern ist sie dagegen irreversibel und unterstreicht die Schutzfunktion hoher intrazellulärer GSH-Konzentrationen. Möglicherweise reagiert CDNB wegen des GSH-Mangels mit Membran-SH-Gruppen, deren Bedeutung für den Aminosäuretransport der sinusoidalen Membran (111) und Erythrozyten (114) bereits beschrieben wurde.

Reversible Inhibierung der Taurocholat-Ausscheidung in die Galle wurde ebenfalls mit Diethylmaleat beobachtet. Phoron dagegen inhibiert kaum (Tab. 5) in Übereinstimmung mit (112), wo für Gallensäu-

ren und BSP bzw. anderen organischen Anionen separate Transportwege postuliert werden. Möglicherweise bestehen hier aber mehrere Transportwege, die von bestimmten S-Konjugaten und Gallensäuren jeweils bevorzugt werden. Selbst die Ausscheidung verschiedener Gallensäuren erfolgt nicht einheitlich durch ein Transportsystem (113). Insofern muß die unter verschiedenen metabolischen Bedingungen beobachtete Inhibierung der Taurocholat-Ausscheidung nicht unbedingt für die Ausscheidung anderer Gallensäuren bzw. die Hemmung der Taurocholat-Ausscheidung durch S-Konjugate nicht für alle S-Konjugate zutreffen.

Durch diese Untersuchungen wird gezeigt, daß der intrazelluläre Thiol-Status eine regulatorische Funktion bei der Ausscheidung von Taurocholat besitzt, die vielleicht für andere Transportprozesse ebenso zutrifft, da die Beteiligung von Sulfhydrylgruppen an Transportprozessen nachgewiesen ist (111, 114) und GSSG mit Membran-Thiolen reagieren kann (114).

5. Zusammenfassung

Unter oxidierenden Bedingungen steigt der intrazelluläre Glutathiondisulfid-Gehalt der Leber auf das Mehrfache an und korreliert mit der stimulierten Glutathiondisulfid-Ausscheidung in die Galle. Es wird vorgeschlagen, die biliäre GSSG-Ausscheidung als ein Maß für die intrazelluläre GSSG-Konzentration zu betrachten.

Der Galle/Zytosol-Konzentrationsgradient für GSSG beträgt etwa 50 und erfordert die Existenz eines aktiven GSSG-Transportsystems. Die Hemmung des stimulierten GSSG-Transports in die Galle während der durch 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol oder Sulfobromophthalein S-Glutathion induzierten kanalikulären S-Konjugat-Ausscheidung steht im Einklang mit der Existenz eines trägervermittelten Transportsystems. Umgekehrt hemmt auch ein erhöhter GSSG-Efflux die Ausscheidung von S-Konjugaten in die Galle.

Glutathion S-Konjugate beeinflussen den GSH/GSSG-Status der Leber weiterhin durch reversible, nicht-kompetitive Hemmung der Glutathion-Reduktase. S-Konjugation elektrophiler Moleküle (1-Chloro-2,4-dinitrobenzol, Sulfobromophthalein), die die GSSG-Reduktase ebenfalls hemmen, schützt folglich nicht vor reversibler Enzymhemmung und unterstreicht die Bedeutung einer effektiven S-Konjugat-Ausscheidung in die Galle.

Die Korrelation zwischen dem intrazellulären GSSG-Gehalt und der Hemmung der kanalikulären Taurocholat-Ausscheidung zeigt die Bedeutung des Thiol-Status der Leber bei der Regulation der biliären Taurocholat-Ausscheidung. H_2O_2 und Menadion (Vitamin K_3) inhibieren den Taurocholat-Efflux nur dann, wenn ihr weiterer Metabolismus zur gesteigerten GSSG-Bildung führt. Bei Selenmangel führt die Gabe von H_2O_2 und Menadion nicht zur gesteigerten GSSG-Bildung und damit nicht zur Hemmung der Taurocholat-Ausscheidung in die Galle.

6. Literatur

(1) Bus, J.S. and Gibson, J.E. (1979) in:
Reviews in Biochemical Toxicology, vol.1 (Hodgson, E., Bend, J.R. and Philipot, R.M., eds) pp. 125-149, Elsevier, New York.

(2) McCord, J.M. (1979) in:
Reviews in Biochemical Toxicology, vol.1 (Hodgson, E., Bend, J.R. and Philipot, R.M., eds) pp. 109-124, Elsevier, New York.

(3) Brawn, K. and Fridovich, I. (1980)
Acta Physiol Scand 492, 9-18.

(4) Tappel, A.L. (1973)
Fed. Proc. 32, 1870-1874.

(5) Pryor, W.A. (1973)
Fed. Proc. 32, 1862-1869.

(6) Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979)
Physiol. Rev. 59, 527-605.

(7) Kellog, E.W. and Fridovich, I. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 8812-8816.

(8) McCay, P.B. and Poyer, J.L. (1976) in:
The Enzymes of Biological Membranes, vol.4 (Martonosi, A.,ed) pp. 239-256, Plenum Press, New York.

(9) McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 6049-6055).

(10) Oshino, N. and Chance, B. (1977)
Biochem. J. 162, 509-525.

(11) Orrenius, S. and Jones, D.P. (1978) in:
Functions of Glutathione in Liver and Kidney (Sies, H. and Wendel, A., eds) pp. 164-175, Springer, Berlin, New York.

(12) Wendel, A. (1980) in:
Enzymatic Basis of Detoxication, vol.1 (Jakoby, W.B., ed) pp. 333-353, Academic Press, New York.

(13) Prohaska, J.R. and Ganther, H.E. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 437-445.

(14) Burk, R.F., Nishiki, K., Lawrence, R.A. and Chance, B. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 43-46.

(15) Williams, C.H.Jr. (1976) in:
The Enzymes, vol.13 (Boyer, P.D., ed) pp. 89-173, Academic Press, New York.

(16) Mize, C.E. and Langdon, R.G. (1962)
J. Biol. Chem. 237, 1589-1595.

(17) Eggleston, L.V. and Krebs, H.A. (1974)
Biochem. J. 138, 425-435

(18) Sies, H. and Summer, K.H. (1975)
Europ. J. Biochem. 57, 503-512.

(19) Necheles, T.F. (1973) in:
Glutathione (Flohe, L., Benöhr, L.H.C., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A., eds) pp. 173-180, Thieme, Stuttgart.

(20) Younes, M. and Siegers, C.-P. (1980)
Res. Commun. Chem. Path. Pharmac. 27, 119-128.

(21) Reed, D.J. and Beatty, P.W. (1978) in:
Functions of Glutathione in Liver and Kidney (Sies, H. and Wendel, A., ed) pp. 13-21, Springer, Berlin, New York.

(22) Meister, A. and Tate, S.S. (1976)
Annu. Rev. Biochem. 45, 559-604.

(23) Sies, H. Gerstenecker, C., Menzel, H. and Flohe, L. (1972)
FEBS Lett. 27, 171-175.

(24) Srivastava, S.K. and Beutler, E. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 9-16.

(25) Srivastava, S.K. and Beutler, E. (1969)
Biochem. J. 112, 421-425.

(26) Sies, H., Wahlländer, A. and Waydhas, C. (1978) in:
Functions of Glutathione in Liver and Kidney (Sies, H. and Wendel, A., eds) pp. 120-126, Springer, Berlin, New York.

(27) Levine, W.G. (1978)
Ann. Rev. Pharmacol. 18, 81-96.

(28) Akerboom, T.P.M., Gärtner, M. and Sies, H. (1981)
Bull. Europ. Physiopath. Resp. 17, 221-227.

(29) Kondo, T., Dale, G.L. and Beutler, E. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 6359-6362.

(30) Sies, H., Summer, K. and Grosskopf, M. (1976) in:
Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J.M., Söling, H.D. and Williamson, J.R., eds) pp. 317-322, North Holland, Amsterdam.

(31) Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1973) in:
Glutathione (Flohe, L., Benöhr, L.C.H., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A., eds) pp. 276-286, Thieme, Stuttgart.

(32) Ernest, M.J. and Kim, K. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 1550-1555.

(33) Akerboom, T.P.M., Bilzer, M. and Sies, H. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 4248-4252.

(34) Hahn, R. and Oberrauch, W. (1978) in:
Functions of Glutathione in Liver and Kidney (Sies, H. and Wendel, A., eds) pp. 32-40, Springer, Berlin, New York.

(35) Jakoby, W.B. and Habig, W.H. (1980) in:
Enzymatic Basis of Detoxication, vol.II (Jakoby, W.B. ed)
pp. 63-94, Academic Press, New York.

(36) Chasseaud, L.F. (1974) in:
Glutathione (Flohe, L., Benöhr, L.H.C., Sies, H., Waller, H.D.
and Wendel, A., eds) pp. 90-109, Thieme, Stuttgart.

(37) Wahlländer, A., Soboll, S. and Sies, H. (1979)
FEBS Lett. 97, 138-140.

(38) Morgenstern, R., de Pierre, J.W. and Ernester, L. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 657-663.

(39) Orrenius, S. and Sies, H. (1982) in:
Metabolic Compartmentation (Sies, H. ed) pp. 485-520,
Academic Press, New York.

(40) Tate, S.S. (1980) in:
Enzymatic Basis of Detoxication, vol.II (Jakoby, W.B. ed)
pp. 95-120, Academic Press, New York.

(41) Wahlländer, A. and Sies, H. (1979)
Eur. J. Biochem. 96, 441-446.

(42) Schulze, P.J., Czok, G. and Borck, H.U. (1976)
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 264, 79-85.

(43) Levine, W.G. (1983) in:
Biological Basis of Detoxication (Caldwell, J. and Jakoby,
W.B., eds) pp. 251-285, Academic Press, New York.

(44) Matern, S. and Gerok, W. (1979)
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 85, 125-204.

(45) Anwer, M.S., Kroker, R. and Hegner, D. (1976)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1477-1486.

(46) Strange, R.C., Cramb, R., Hayes, D. and Percy-Robb, I.W. (1977)
Biochem. J. 165, 425-429.

(47) Hayes, D., Strange, R.C. and Percy-Robb, I.W. (1979)
Biochem. J. 181, 699-708.

(48) Paumgartner, G., Herz, R., Sauter, K. and Schwarz, H.P. (1974)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 285, 165-174.

(49) Boyer, J.L. (1980)
Physiol. Rev. 60, 303-326.

(50) Sies, H. (1978)
Methods Enzymol. 52, 48-59.

(51) Younes, M. and Siegers, C.-P. (1981)
Chem. Biol. Interactions 34, 257-266.

(52) Akerboom, T.P.M. and Sies, H. (1981)
Methods Enzymol. 77, 373-382.

(53) Häcki, W. and Paumgartner, G. (1973)
Experentia 29, 1091-1093.

(54) Tietze, F. (1969)
Analyt. Biochem. 27, 502-522.

(55) Habig, W.F., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 7130-7139.

(56) Bergmeyer, H.U., ed (1974)
Methoden der Enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim.

(57) Awasthi, Y.C., Cary, H.S., Dao, D.D., Partidge, C.A. and Srivastava, S.U. (1981)
Blood 58, 733-738.

(58) Reed, D.J., Babson, J.R., Beatty, P.W., Brodie, A.E., Ellis, W.W. and Potter, D.W. (1980)
Anal. Biochem. 106, 55-62.

(59) Whelan, G., Hoch, J. and Combes, B. (1970)
Clin. Med. 75, 542-557.

(60) Pfaff, E., Schwenk, M., Burr, R. and Remmer, H. (1975)
Molec. Pharmacol. 11, 144-152.

(61) Bisswanger, H. (1979)
Theorie und Methoden der Enzymkinetik, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.

(62) Cleland, W.W. (1963)
Biochem. Biophys. Acta 67, 173-187.

(63) Lawrence, R.A. and Burk, R.F. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 952-958.

(64) Boyd, M.R. (1980) in:
Reviews in Biochemical Toxicology, vol.2 (Hodgson, E., Bend, J.R. and Philipot, R.M., eds) pp. 71-101, Elsevier, New York.

(65) Buzard, J.A., Kopko, F. and Paul, M.F. (1960)
J. Lab. Clin. Med. 56, 884-890.

(66) Hissin, J.P. and Hilf, R. (1976)
Anal. Biochem. 74, 214-226.

(67) Eberle, D., Clarke, R. and Kaplowitz, N. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 2115-2117.

(68) Williamson, R.J. (1969) in:
The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria (Papa, S., Tager, J.M., Quagliariello, E. and Slater, E.C., eds) pp. 385-400, Adriatica Editrice, Bari, Italy.

(69) Sies, H., Koch, R., Martini, E. and Boveris, A. (1979)
FEBS Lett. 103, 287-290.

(70) Bartoli, G.M. and Sies, H. (1978)
FEBS Lett. 86, 89-91.

(71) Sies, H., Bartoli, G.M., Burk, R.F. and Waydhas, C. (1978)
Eur. J. Biochem. 89, 113-118.

(72) Pryor, W.A. (1978)
Photochem. and Photobiol. 28, 787-801.

(73) Sies, H., Wahlländer, A., Waydhas, C., Soboll, S. and Häberle, D. (1980)
Adv. Enz. Regul. 18, 303-320.

(74) Barnhart, J.L. and Combes, B. (1978)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 206, 614-623.

(75) Kappus, H. and Sies, H. (1981)
Experentia 37, 1233-1241.

(76) Eklöw, L., Hjordis, T. and Orrenius, S. (1981)
FEBS Lett. 127, 125-128.

(77) Losito, R., Owen, C.A. and Flock, E.V. (1967)
Biochemistry 6, 62-68.

(78) Nickerson, W.J., Falcone, G. and Strauss, G. (1963)
Biochemistry 2, 537-543.

(79) Krohne-Ehrich, G., Schirmer, R.H. and Untucht-Grau, R. (1977)
Eur. J. Biochem. 80, 65-71.

(80) Krauth-Siegel, R.L., Blatterspiel, R., Saleh, M., Schiltz, E. Schirmer, R.H. and Untucht-Grau, R. (1982)
Eur. J. Biochem. 121, 259-267

(81) Schulz, G.E., Schirmer, R.H. and Pai, E.F. (1982)
J. Mol. Biol. 160, 287-308.

(82) Bilzer, M., Krauth-Siegel, R.L., Schirmer, R.H., Akerboom, T.P.M., Sies, H. and Schulz, G. (1984)
Eur. J. Biochem. 138, 373-378.

(83) Pinto, R.E. and Bartley, W. (1969)
Biochem. J. 112, 109-115.

(84) Plaa, G.L. and Priestley, B.G. (1976)
Pharmacol. Rev. 28, 207-273.

(85) Kosower, E.M., Correa, W., Kinon, B.J. and Kosower, N.S. (1972)
Biochem. Biophys. Acta 264, 39-44.

(86) Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1978)
Intern. Rev. Cytol. 54, 109-160.

(87) Veech, R.L., Eggleston, L.V. and Krebs, H.A. (1969)
Biochem. J. 115, 609-619.

(88) Boyland, E. and Speyer, B.E. (1970)
Biochem. J. 119, 463-472.

(89) Kaplowitz, N., Eberle, D.E., Petrini, J., Touloukian, J., Corvasce, M.C. and Kuhlenkamp, J. (1983)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 224, 141-147.

(90) Akerboom, T.P.M., Bilzer, M. and Sies, H. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 5838-5843.

(91) Boyland, E. and Chasseaud, L.F. (1969)
Biochem. J. 115, 985-991.

(92) Combes, B. and Backof, B. (1982)
Biochem. Pharmacol. 31, 2669-2674.

(93) Akerboom, T.P.M., Bilzer, M. and Sies, H. (1982)
FEBS Lett. 140, 73-76.

(94) Sies, H., Brigelius, R. and Akerboom, T.P.M. (1983) in: Funktions of Glutathione - Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects (Larsson, A., Orrenius, S., Holgreen, A. and Mannervik, B., eds) pp. 51-64, Raven Press, New York.

(95) Akerboom, T.P.M., Bilzer, M. and Sies, H. (1982) in: EBEC Reports, Vol.2 (Second european bioenergetics conference, eds) pp. 493-494, LBTM-CNRS Edition, Villeurbanne.

(96) Board, P.G. (1981)
FEBS Lett. 124, 163-165.

(97) Kondo, T., Murao, M. and Tanigushi, N. (1982)
Eur. J. Biochem. 125, 551-554.

(98) Akerboom, T.P.M., Inoue, M., Sies, H., Kinne, R. and Arias, I.M. (1984)
Eur. J. Biochem. 141, 211-215.

(99) Inoue, M., Akerboom, T.P.M., Sies, H., Kinne, R., Thao, T. and Arias, I.M. (1984) J. Biol. Chem. 259, 4998-5002.

(100) Scopes, R.K. (1982)
Protein Purification, Principles and Practice, Springer, New York, Heidelberg, Berlin.

(101) Boggaram, V. and Mannervik, B. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 558-564.

(102) Untucht-Grau, R., Schulz, G.E. and Schirmer, R.H. (1979)
FEBS Lett. 105, 244-248.

(103) Schulze, P. and Czok, G. (1975)
Toxicol. appl. Pharmac. 45, 213-224.

(104) Schwenk, M., Burr, R., Baur, H. and Pfaff, E. (1977)
Biochem. Pharmac. 26, 825-832.

(105) Laperche, Y. and Oudea, P. (1974)
J. Pharmac. exp. Ther. 197, 235-244.

(106) Killenberg, P. and Hoppel, C.L. (1973)
Molec. Pharmac. 10, 108-118.

(107) Brigelius, R., Lenzen, R. and Sies, H. (1982)
Biochem. Pharmacol. 31, 1637-1641.

(108) Axelsson, K., Eriksson, S. and Mannervik, B. (1978)
Biochemistry 17, 2978-2984.

(109) Mannervik, B. (1980) in:
Enzymatic Basis of Detoxication, vol.II (Jakoby, W.B., ed)
pp. 229-244, Academic Press, New York.

(110) Haest, C.W.M., Kamp, D. and Deuticke, B. (1979)
Biochem. Biophys. Acta 557, 363-371.

(111) Sips, H.J. and van Dam, K. (1981)
J. Membr. Biol. 62, 213-237.

(112) Levine, W.G. (1981) in:
Progress in Drug Research, vol.25, pp. 361-420, Birkhäuser
Verlag, Basel.

(113) Meijer, D.K.F., Vonk, R.J., Scholtens, E.J. and Levine, W.G.
(1976)
Drug Metab. Dispos. 4, 1-7.

(114) Young, J.D. (1980)
Biochem. Biophys. Acta 602, 661-672.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Sies für die Überlassung des Themas und die stete Betreuung und Unterstützung der Arbeit.

Herrn Dr. T.P.M. Akerboom danke ich für die intensive Betreuung bei der Planung und Durchführung der Versuche, vor allem aber für die zahlreichen Diskussionen über das Thema dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Teschke danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Frau M. Gärtner danke ich für die qualifizierte und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Lebenslauf

Am 9. März 1959 wurde ich in Bochum als Sohn des Ausbildungsleiters Horst Bilzer und seiner Ehefrau Renate, geb. Andrejewski, geboren.

Ostern 1965 wurde ich in die Grundschule eingeschult. Nach vier Grundschuljahren besuchte ich ab Sommer 1969 das Heinrich von Kleist-Gymnasium in Bochum. Im Sommer 1973 wechselte ich zum Amplonius-Gymnasium in Rheinberg, wo ich im Juni 1978 die Abiturprüfung bestand.

Im Wintersemester 1978/79 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf. Das Praktische Jahr des Studiums verbrachte ich im St. Johannes-Hospital in Duisburg-Hamborn, wo ich im November 1984 die Ärztliche Prüfung bestand.

Im Februar 1981 begann ich unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. H. Sies am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Düsseldorf mit der Bearbeitung der vorliegenden Dissertation.

Abstract

Unter oxidierenden Bedingungen steigt der intrazelluläre Glutathiondisulfid-Gehalt der Leber auf das Mehrfache an und korreliert mit der stimulierten Glutathiondisulfid-Ausscheidung in die Galle. Es wird vorgeschlagen, die biliäre GSSG-Ausscheidung als ein Maß für die intrazelluläre GSSG-Konzentration zu betrachten.

Der Galle/Zytosol-Konzentrationsgradient für GSSG beträgt etwa 50 und erfordert die Existenz eines aktiven GSSG-Transportsystems. Die Hemmung des stimulierten GSSG-Transports in die Galle während der durch 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol oder Sulfobromophthalein S-Glutathion induzierten kanalikulären S-Konjugat-Ausscheidung steht im Einklang mit der Existenz eines trägervermittelten Transportsystems. Umgekehrt hemmt auch ein erhöhter GSSG-Efflux die Ausscheidung von S-Konjugaten in die Galle.

Glutathion S-Konjugate beeinflussen den GSH/GSSG-Status der Leber weiterhin durch reversible, nicht-kompetitive Hemmung der Glutathion-Reduktase. S-Konjugation elektrophiler Moleküle (1-Chloro-2,4-dinitrobenzol, Sulfobromophthalein), die die GSSG-Reduktase ebenfalls hemmen, schützt folglich nicht vor reversibler Enzymhemmung und unterstreicht die Bedeutung einer effektiven S-Konjugat-Ausscheidung in die Galle.

Die Korrelation zwischen dem intrazellulären GSSG-Gehalt und der Hemmung der kanalikulären Taurocholat-Ausscheidung zeigt die Bedeutung des Thiol-Status der Leber bei der Regulation der biliären Taurocholat-Ausscheidung. H_2O_2 und Menadion (Vitamin K_3) inhibieren den Taurocholat-Efflux nur dann, wenn ihr weiterer Metabolismus zur gesteigerten GSSG-Bildung führt. Bei Selenmangel führt die Gabe von H_2O_2 und Menadion nicht zur gesteigerten GSSG-Bildung und damit nicht zur Hemmung der Taurocholat-Ausscheidung in die Galle.